

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Lucie Otrubová

**OPTIMALIZACE MIKROEXTRAKČNÍ TECHNIKY PRO
ANALÝZU VOD CHROMATOGRAFICKÝMI METODAMI**

Optimization of microextraction technique for analysis of water by
chromatographic methods

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Radomír Čabala Ph.D.

Praha 2014

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 14.5.2014

.....

Lucie Otrubová

PODĚKOVÁNÍ:

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Radomíru Čabalovi Ph.D. a Mgr. Miroslavě Bursové za odborné vedení, za vřelý přístup a ochotu, se kterou mi poskytli pomoc při práci a celému kolektivu laboratoře za všestrannou pomoc při vypracování této diplomové práce.

Současně bych ráda poděkovala svoji mamince za umožnění studia na vysoké škole a za podporu během celého studia.

ABSTRAKT:

V této diplomové práci byla optimalizována nová metoda mikroextrakce kapalinou kapalinou (LPME), ve které byl použit plastový nástavec se zúženou špičkou jako extrakční aparatura. Koncentrace analytů byly měřeny na GC-MS.

K optimalizaci byla použita chemometrická metoda Face centered design a výsledky byly zpracovány v programu Minitab 16. Parametry, které byly optimalizovány, byly objem vzorku, objem rozpouštědla, čas mikroextrakce, rychlost míchání, iontová síla a čas po mikroextrakci. Jako odezva systému byl zvolen součet relativních ploch píku všech analytů. Testovanými analyty byly toluen, tetrachlorethylen, ethylbenzen, xyleny, mesitylen a naftalen a jako vnitřní standard byl použit methylnhexadekanoát.

Zjištěné optimální podmínky systému byly 20 mL vzorku, 300 μ L rozpouštědla, 20 minut mikroextrakce, rychlost míchání 700 rpm, žádný přídavek soli a čas po mikroextrakci 3,5 minuty. Koeficient determinace byl 0,9700 a lack-of-fit byl nevýznamný, což ukazovalo na dobrou shodu modelu s naměřenými daty.

Prekoncentrační faktor se pohyboval od 26 pro tetrachlorethylen do 39 pro xyleny. Výťažnost mikroextrakce byla v rozmezí od 39,5 % pro tetrachlorethylen až do 59,1 % pro p-xylen a m-xylen. Nová metoda byla testována analýzou reálných vzorků pitné, říční a vody z čistírny odpadních vod. Vzorky byly spikovány analyty na koncentraci přibližně 10 LOQ a 50 ng/mL. U pitné vody se recovery pohybovala od 78 do 102 %, u říční vody od 81 do 108 % a u vody z čistírny odpadních vod od 81 do 104 %. Největší recovery vždy bylo u toluenu a naftalenu.

KLÍČOVÁ SLOVA:

optimalizace analytických metod, mikroextrakce, chromatografie

ABSTRACT:

New liquid phase microextraction (LPME) has been optimized. Plastic adapter with tapered tip was used as extraction device. Concentration of analytes was determined by GC-MS.

Face centered design was used to optimize LPME and the results were evaluated by Minitab 16 programme. Volume of sample, volume of extraction solvent, stirring rate, extraction time, ionic strength and time after microextraction were optimized. Response of system was defined as the sum of the peak relative areas. Toluene, tetrachlorethylene, ethylbenzene, xylenes, mesitylene and naphthalene were the studied analytes. Methylhexadecanoate was used as an internal standard.

Optimal system conditions were as follows: 20 mL sample volume, 300 μ L extraction solvent volume, 20 minutes, stirring speed 700 rpm, no addition of salt, and time after microextraction 3.5 minutes. Determination coefficient was 0.9700 and the lack-of-fit was insignificant which indicated good agreement of the model with the experimental data.

The preconcentration factor ranged from 26 (tetrachlorethylene) to 39 (xylenes). The microextraction yield was varied from 39.5% (tetrachlorethylene) to 59.1% (p-xylene and m-xylene). The new method was tested by analyzing real samples of tap water, river water and water from the sewage treatment plant. The samples were spiked at a concentration approximately 10 times LOQ of analytes and 50 ng/mL. Recovery was found in the range 78-102 % for tap water, 81 - 108% for river water and 81 - 104 % for water from the sewage. Toluene and naphthalene had the largest recovery.

KEY WORDS:

optimization of analytical methods, microextraction, chromatography

Obsah

1	SEZNAM ZKRATEK	7
2	ÚVOD	9
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1	Mikroextrakční metody	10
3.1.1	Princip extrakce.....	10
3.1.2	Základní metody mikroextrakce kapaliny kapalinou.....	13
3.2	Optimalizace	21
3.2.1	Postup optimalizace	22
3.2.2	Druhy experimentálních designů.....	24
3.3	Studované látky	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
4.1	Standardy a chemikálie.....	31
4.2	Přístrojové vybavení.....	31
4.3	Příprava roztoků.....	32
4.4	Optimalizace mikroextrakce	33
4.5	Postup mikroextrakce	34
4.6	Analýza GC - MS	35
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
5.1	Optimalizace mikroextrakce	37
5.1.1	Výběr úrovně pro testované parametry	37
5.1.2	Volba designu	39
5.1.3	Vyhodnocení navrženého designu	41
5.1.4	Nalezení optimálních hodnot.....	43
5.2	Kalibrační závislosti	50
5.3	Analýza reálných vzorků vody.....	54
6	ZÁVĚR.....	58
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59

1 SEZNAM ZKRATEK

AAS - atomová absorpční spektrometrie

ANOVA - analýza rozptylu

$a_{(X_{aq})}$ - aktivita extrahované látky X ve vodném vzorku

$a_{(X_{org})}$ - aktivita extrahované látky X v organické fázi

BTEX - benzen, toluen, ethylbenzen a xyleny

c_{aq} - celková koncentrace látky ve vodném vzorku

c_{org} - celková koncentrace látky v organické fázi

$c_{aq,eq} = X_{aq}$ - rovnovážná koncentrace ve vodném vzorku

$c_{org,eq} = X_{org}$ - rovnovážná koncentrace v organické fázi

CCD - central composite design, experimentální design

CE - kapilární elektroforéza

CFME - continuous flow microextraction, mikroextrakce v kontinuálním toku

c_p - počet opakovaných měření v centrálním bodě

D - koncentrační rozdělovací poměr

DI-SDME - direct immersion single drop microextraction, mikroextrakce na jedné kapce s přímým ponořením

DLLME - dispersive liquid liquid microextraction, disperzní mikroextrakce kapaliny kapalinou

DLLME-SFO - dispersive liquid liquid microextraction method based on solidification of a floating organic drop, disperzní mikroextrakce kapaliny kapalinou založená na tuhnutí plovoucí kapky

DSDME - directly suspended droplet microextraction, mikroextrakce kapkou přímo nadávkovanou na hladinu roztoku

FT-LPME - fiber in tube liquid phase microextraction, mikroextrakce s trubičkou naplněnou vlákny

GC-MS - plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

HF-LPME - hollow fibre liquid phase microextraction, mikroextrakce v dutém vlákně

HFH-LPME - hollow fiber membrane liquid phase microextraction, mikroextrakce s dutým vláknem z membrány

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HS-SDME - headspace single drop microextraction, headspace mikroextrakce na jedné kapce

k - počet parametrů

κ - rozdělovací konstanta

K_D^0 - termodynamická rozdělovací konstanta

LLE - liquid liquid extraction, extrakce kapaliny kapalinou

LOD - limit detekce

LOQ - limit stanovitelnosti

LPME - liquid phase microextraction, mikroextrakce kapaliny kapalinou

m/z - poměr hmotnosti a náboje

N - počet měření

OVAT - one-variable-at-a-time, optimalizační metoda

PF - prekoncentrační faktor

RSM - response surface methodology, metodologie odezvové plochy

SCAN - způsob měření během hmotnostní detekce

SDME - single drop microextraction, mikroextrakce na jedné kapce

SFDME - solidification of floating drop microextraction, mikroextrakce s tuhnoucí plovoucí kapkou

SFE - super critical fluid extraction, superkritická fluidní extrakce

SIM - - způsob měření během hmotnostní detekce

S/N - poměru signálu k šumu

SPE - solid phase extraction, extrakce pevnou fází

2 ÚVOD

Mikroextrakce kapaliny kapalinou (LPME) je jednoduchá, rychlá a levná metoda extrakce a prekoncentrace analytu během chemické analýzy. LPME vznikla z klasické extrakce kapaliny kapalinou (LLE), oproti které má mnoho výhod. Například při LLE je spotřebováno několik mililitrů organického rozpouštědla, ale pro LPME je potřeba pouze několik mikrolitrů, a proto snižuje znečišťování životního prostředí.

Hlavním předmětem této diplomové práce je LPME metoda, která je modifikací mikroextrakce, ve které je na hladinu vodného vzorku přímo nadávkováno extrakční rozpouštědlo. Její nevýhoda však spočívá v obtížnosti odebrání malého objemu rozpouštědla po mikroextrakci. V nové metodě je použit nástavec se zúženou špičkou a tím bude řešen problém s odebráním organické fáze.

Cílem této práce je optimalizovat novou LPME techniku pomocí chemometrické metody Face centered design a dále při nalezených optimálních podmínkách určit prekoncentrační faktor pro studované analyty a výtěžnost metody. Poslední část práce je zaměřena na analýzu reálných vzorků pitné, říční a vody z čistírny odpadních vod. Stanovit studované analyty a při negativním výsledku spikovat vzorky a určit recovery.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Mikroextrakční metody

Přečištění vzorku je velice důležitý krok v chemické analýze, zvláště pokud je stanovováno stopové množství analytu v komplexní matrici. Proto jsou stále vyvíjeny extrakční metody, jako je extrakce kapalinou kapalinou (Liquid liquid extraction, LLE), extrakce pevnou fází (Solid phase extraction, SPE) a superkritická fluidní extrakce (Super critical fluid extraction, SFE). LLE je v praxi velice používaná extrakce, i přestože její postup je časově náročný, vyžaduje velké množství toxických organických rozpouštědel a není dostatečně citlivá pro stopovou analýzu^{1, 2}.

Současné vědecké trendy směřují k zjednodušení a miniaturizaci klasické LLE a to tím, že snižují poměr mezi objemy vodné a organické fáze. Proto byla zavedena nová metoda mikroextrakce kapalinou kapalinou (LPME), kde je potřeba pouze několika mikrolitrů rozpouštědla, kdežto u LLE jsou používány stovky mililitrů. Další výhody LPME oproti LLE jsou, že je rychlejší, jednodušší, levná a více kompatibilní s GC, HPLC a CE³. Dále splňuje požadavky zelené chemie, což je nová oblast, jejíž jeden cíl je snížení spotřeby toxických rozpouštědel, aby bylo zamezeno znečišťování životního prostředí a bylo chráněno zdraví lidí^{4, 5}.

3.1.1 Princip extrakce

Extrakce z kapalinou do kapalinou je separační metoda, ve které jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné kapaliny. Základní princip extrakce je přechod rozpuštěné látky z jedné fáze do druhé, během kterého je dosaženo rovnováhy a poměr koncentrací látky v obou fázích je konstantní při dané teplotě. Tento proces popisuje Nernstův rozdělovací zákon:

$$K_D^0 = \frac{a_{(X_{org})}}{a_{(X_{aq})}} \quad (3.1)$$

kde K_D^0 je termodynamická rozdělovací konstanta, $a_{(X_{org})}$ je aktivita extrahované látky X v organické fázi a $a_{(X_{aq})}$ je aktivita extrahované látky X ve vodném vzorku. Jestliže je roztok dostatečně zředěný, tak lze aktivity zaměnit za rovnovážné koncentrace v jednotlivých fázích (X_{org} nebo $c_{org,eq}$ a X_{aq} nebo $c_{aq,eq}$):

$$\kappa = \frac{[X_{org}]}{[X_{aq}]} = \frac{c_{org,eq}}{c_{aq,eq}} \quad (3.2)$$

kde κ je rozdělovací konstanta. Koncentrační rozdělovací poměr D je dán poměrem celkových koncentrací látky (c_{org} nebo c_{aq}) ve všech formách, ve kterých se vyskytuje v jednotlivých fázích:

$$D = \frac{c_{org}}{c_{aq}} \quad (3.3)$$

Při ideálních podmínkách, kdy extrahovaná látka nereaguje se žádnou složkou obsaženou v rozpouštědle nebo vodném vzorku, lze koncentrační rozdělovací poměr zaměnit za rozdělovací konstantu⁶.

Selektivitu metody je možné ovlivnit výběrem rozpouštědla nebo směsí rozpouštědel, úpravou pH nebo iontové síly vodného roztoku. LPME je kombinace extrakce a prekoncentrace, jejíž výhoda je vynechání kroku, kdy je zakoncentrován analyt z extrakčního činidla. Zakoncentrování způsobuje nižší výtěžnost extrakce, protože dochází ke ztrátám těkavých látek, a je zvyšována koncentrace nečistot původně obsažených v rozpouštědle. Rychlost extrakce závisí na velikosti a tvaru extrahované látky, na viskozitě organického rozpouštědla a na velikosti mezifázového povrchu⁶.

Výtěžek mikroextrakce ovlivňuje volba extrakčního činidla, jeho množství, extrakční čas, rychlost míchání a iontová síla vzorku¹.

Vhodné extrakční činidlo by mělo mít dobrou afinitu pro studované analyty, nemělo by být mísitelné s vodou a musí být stabilní během mikroextrakce. Dále musí být vhodné pro následující detekční metodu, například pokud následuje analýza na GC, tak je vhodné použít těkavé rozpouštědlo. Pro snížení znečištění životního prostředí je doporučeno používat méně toxická rozpouštědla¹. Nejčastěji jsou pro extrakci nepochlorných látek používány alkanoly nebo nižší chlorné uhlovodíky, například pentan, hexan, dichlormethan. Pro selektivní extrakce lze použít rozvětvené uhlovodíky nebo směsi rozpouštědel, například pro polární látky methyl terc butyl ether nebo směs diethyl etheru a pentanu⁶.

Množství extrakčního činidla ovlivňuje extrakční výtěžnost, protože má vliv na velikost povrchu extrakční fáze, a proto na množství přeneseného analytu. Čím je větší objem rozpouštědla, tím je vyšší výtěžnost, ale klesá koncentrace analytu a je potřeba zakonzentrování, které může způsobit ztrátu těkavých analytů a zvýšení koncentrace interferentů z rozpouštědla. Proto je upřednostněno použít menší objem rozpouštědla, i když je získána nižší výtěžnost⁶.

Čas mikroextrakce závisí na způsobu provedení a na objemu obou fází. Běžné je rozmezí od 30 sekund až po několik desítek minut⁶. Jelikož LPME není vyčerpávající extrakční technika, tak je během extrakce dosaženo pouze rovnováhy¹.

Při mikroextrakci je velmi důležité dokonalé promíchání obou fází. Míchání zajišťuje kontakt mezi vodnou a organickou fází a způsobuje distribuci analytu¹.

Výtěžnost extrakce je možné zvýšit přidáním soli do vodného vzorku, protože je tím zvýšena jeho iontová síla, která způsobí snížení rozpustnosti analytu ve vodě. Záleží ale na typu analytu a na koncentraci soli, protože to může způsobit zvýšení, ale i snížení výtěžnosti¹. Toto pravidlo hlavně platí pro klasickou extrakci, ale u mikroextrakce bylo spíše pozorováno snížení výtěžnosti při přidání soli⁷.

LPME je aplikována při analýze organických látek, které jsou těkavé nebo středně těkavé. Nejčastěji je používána pro stanovení alifatických či aromatických uhlovodíků, halogenovaných uhlovodíků, aromatických alkoholů, aromatických nitrosloúčenin a organofosforečných pesticidů v životním prostředí, farmacii, ve forenzní oblasti a v potravinářství⁶.

3.1.2 Základní metody mikroextrakce kapaliny kapalinou

Mikroextrakce na jedné kapce (Single drop microextraction, SDME)

Princip SDME spočívá v distribuci analytu mezi kapkou organického rozpouštědla, která visí na špičce mikrostříkačky, a vodní fází. Mezi těmito fázemi je dosažen rovnovážný poměr koncentrací analytů, poté je kapka nasáta zpět do mikrostříkačky a nadávkována do přístroje, například GC-MS nebo HPLC. Vysokého prekoncentračního faktoru je dosaženo díky velkému poměru mezi objemem vzorku a organické fáze¹.

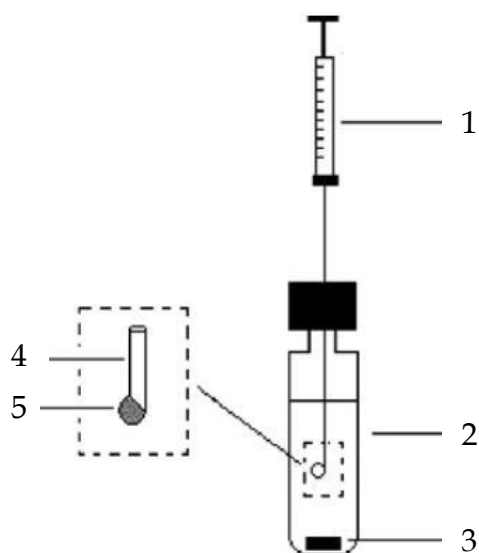
V roce 1996 Liu a Dasgupta byli první, kteří publikovali metodu SDME⁸. Od té doby byla SDME metoda dále vyvíjena a vznikly tři způsoby jejího provedení: SDME s přímým ponořením (Direct immersion single drop microextraction, DI-SDME), headspace SDME (HS-SDME) a mikroextrakce v kontinuálním toku (continuous flow microextraction, CFME)¹.

Mikroextrakce na jedné kapce s přímým ponořením (Direct immersion SDME, DI-SDME)

Jeannot a Cantwell jako první publikovali článek o této metodě, ve kterém popsali kinetickou teorii mikroextrakce⁹. Všeobecný postup této metody je, že kapka ve vodě nemísitelného rozpouštědla visí na konci teflonové tyče a je ponořena do vodného vzorku, který je míchán. Po mikroextrakci je tyč vyjmuta a pomocí mikrostříkačky je vzorek nadávkován k analýze¹.

Mezi hlavní výhody SDME patří, že je to jednoduchá, rychlá a levná metoda. Na druhou stranu při vyšší rychlosti míchání vzorku a ve vzorku s komplexní matricí je kapka nestabilní, a tedy je potřeba pracovat opatrně a pečlivě. Možné řešení je použití mikrostříkaček s upravenou špičkou nebo vzorek s komplexní matricí před extrakcí filtrovat¹⁰. SDME je metoda s nižší citlivostí a přesností, a proto vyžaduje další vývoj¹.

Pro zvýšení výtěžnosti extrakce He a Lee vyvinuli dynamickou LPME, při které je vzorek odebrán do stříkačky, která předem obsahuje organické rozpouštědlo. Extrakce proběhne během několika sekund a následně je vzorek vypouštěn ze stříkačky. Po dalších několika sekundách je opět odebrán do stříkačky a tento proces je opakován několik minut. Poté je obohacená organická fáze použita k analýze analytu¹¹. Dynamické provedení LPME má několik výhod oproti statickému. Přenos analytu je rychlejší, poskytuje vysoký obohacovací faktor a jeho výtěžnost a reprodukovatelnost je také vyšší^{12, 13}.



Obrázek 3.1 - Schéma aparatury na DI-SDME: 1 - mikrostříkačka, 2 - vodná fáze, 3 - magnetické míchadélko, 4 - špička mikrostříkačky, 5 - kapka organické fáze²

Headspace mikroextrakce na jedné kapce (HS-SDME)

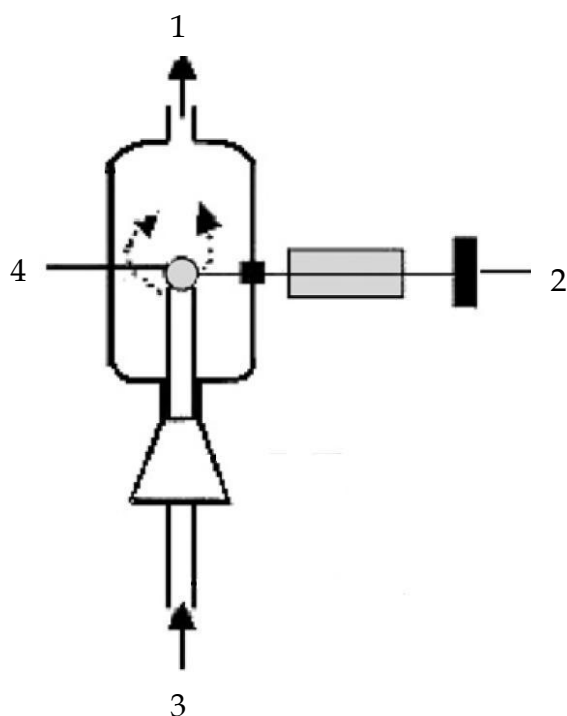
Při této technice je analyt distribuován mezi tři fáze a to vodním vzorkem, headspace a kapkou rozpouštědla. Kapka rozpouštědla je umístěna na špičce mikrostříkačky a v prostoru nad vzorkem. Po extrakci je kapka nasáta do mikrostříkačky a nadávkovaná do přístroje pro další analýzu¹⁴. Přejít z vodní fáze je nejdůležitější krok extrakce, protože vyšší rychlost míchání vzorku usnadňuje přenos analytu³.

Výhody této metody jsou její dobrá izolace analytů od netěkavých látek či interferentů a nízká cena několika mikrolitrů rozpouštědla v porovnání s cenou komerčně vyrobeného vlákna pro headspace mikroextrakci tuhou fází. Její nevýhoda ale spočívá v úzkém výběru rozpouštědel, která mají vysokou teplotu varu¹⁵. Aplikací této metody je stanovení těkavých látek nebo látek upravených derivatizací v životním prostředí, ve forenzní chemii a v potravinářství¹.

Mikroextrakce v kontinuálním toku (Continuous flow microextraction, CFME)

U této metody je kapka rozpouštědla na špičce mikrostříkačky, která je ponořena do proudícího vzorku, čímž dochází k extrakci. Oproti ostatním technikám je rozpouštědlo neustále v kontaktu s čerstvým proudícím vzorkem, a protože dosahuje vysokého prekoncentračního faktoru, tak je potřeba menší množství vzorku¹⁶.

Modifikace spočívá v recyklování vzorku, který už prošel zařízením, takže je vrácen zpět a extrakce je opakována. Tímto postupem lze zvýšit výtěžek extrakce¹⁷.



Obrázek 3.2 - Schéma aparatury na CFME: 1 - odpad 2 - mikrostříkačka, 3 - vstup vodné fáze do aparatury, 4 - kapka organické fáze²

Mikroextrakce v dutém vlákně (Hollow fibre LPME, HF-LPME)

U této metody je používáno levné, jednorázové porézní vlákno s uzavřeným dnem nebo ve tvaru písmene U. Před extrakcí je na krátkou chvíli vlákno ponořeno do organického rozpouštědla tak, aby byly póry naplněny rozpouštědlem a na stěně vlákna byl vytvořen tenký film¹⁸. Díky tomu že rozpouštědlo je nemísitelné s vodou, tak i během extrakce zůstane v pórech, nedojde k jeho ztrátě, a proto lze vzorek míchat libovolnou rychlostí. Další výhodou je, že nedochází ke kontaminaci vzorku do dalších extrakcí, protože vlákno je jednorázové, a tím je i zaručena vysoká reprodukovatelnost¹.

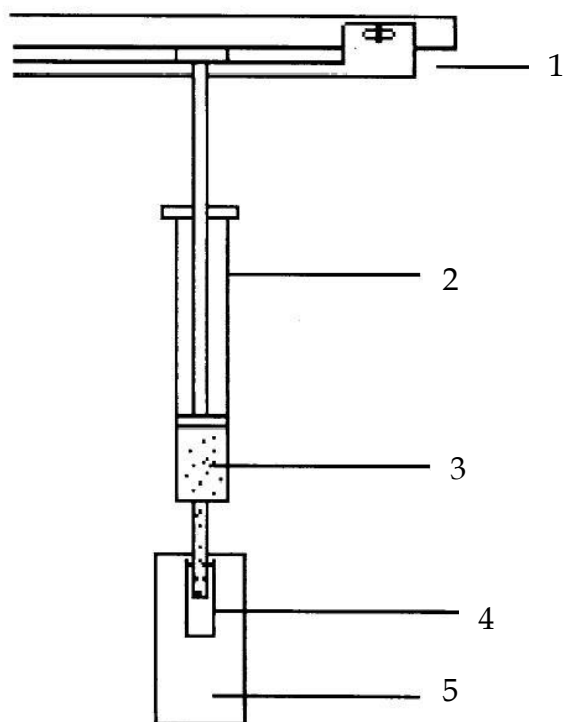
Roztok akceptoru vyplňuje střed vlákna. Pokud je akceptor stejné rozpouštědlo jako v pórech, tak je tento systém nazýván dvoufázový. Pokud je odlišný, tak je to třífázový systém¹⁹.

Ve dvoufázovém systému jsou studované analyty extrahovány z vodního vzorku do organické fáze, která je nejčastěji toluen nebo n-oktanol. Aplikace

metody je pro většinu analytů, které jsou mnohem více rozpustné v organické fázi než ve vodě³.

V třífázovém systému jsou analyty extrahovány z vodního roztoku přes organické rozpouštědlo v pórech vlákna do akceptoru uvnitř vlákna. Tato metoda je limitovaná bazicitou či aciditou analytu. Při extrakci bazických látek musí být pH vzorku upraveno na alkalické, aby byla potlačena ionizace, a tím i rozpustnost analytu. Naopak pH roztoku akceptoru je nízké, aby byla zvýšena ionizace a rozpustnost. Při těchto podmínkách jsou analyty snadno extrahovány do organické fáze a dále do akceptoru, aniž by byly zpět extrahovány do organické fáze. Pro kyselé analyty je to naopak, pH vzorku je nízké a akceptor je alkalický³.

HF-LPME lze dále rozdělit podle provedení a to na statický nebo dynamický režim. Ve statickém je rychlost extrakce ovlivněna intenzitou míchání vzorku. V dynamickém režimu je mikrostříkačka s dutým vláknem připojena k pumpě. Rozpouštědlo je opakovaně nasáto dovnitř stříkačky a opět ven pomocí pumpy. Dynamický režim zrychluje extrakci, poskytuje lepší výtěžnost a zlepšuje opakovatelnost v porovnání se statickým režimem. Hlavní nevýhoda je komplikovaná aparatura, která je potřeba^{20, 21}.



Obrázek 3.3 - Schéma aparatury na dynamickou HF-LPME: 1 - pumpa 2 - stříkačka, 3 - organické rozpouštědlo, 4 - duté vlákno, 5 - vodní vzorek²¹

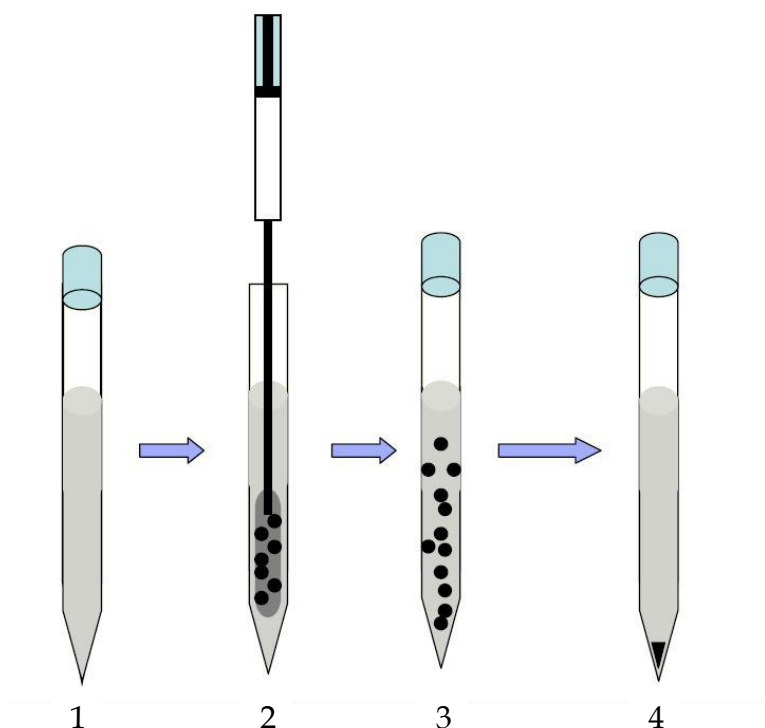
Disperzní mikroextrakce kapaliny kapalinou (Dispersive liquid liquid microextraction, DLLME)

U DLLME je používána extrakční směs z několika mikrolitrů extrakčního rozpouštědla nemísitelného s vodou a s hustotou větší než má voda a řádově mililitrů disperzního rozpouštědla mísitelného jak s vodou, tak s extrakčním rozpouštědlem²². Disperzní rozpouštědlo představuje 97-99 % z celkového objemu extrakční směsi a hraje velice důležitou roli, protože umožňuje extrakčnímu rozpouštědlu vytvořit drobné kapky ve vodném vzorku, do kterých je extrahován analyt. Jako disperzní rozpouštědla jsou používány aceton, methanol, ethanol a acetonitril, protože patří mezi levné a méně toxické látky³.

Postup mikroextrakce začíná přidáním extrakční směsi do vodného vzorku, což vytvoří zakalený roztok z kapek extrakčního rozpouštědla. Během

mikroextrakce jsou analyty velmi rychle distribuovány do extrakčního rozpouštědla, poté je vzorek centrifugován a extrakční rozpouštědlo, které je usazeno na dně zkumavky, je analyzováno. Ke stanovení analytů lze použít GC, HPLC nebo také AAS či UV-VIS spektrometr²²⁻²⁴.

V porovnání s ostatními metodami je díky velké kontaktní ploše mezi kapkami a vzorkem urychlen přenos analytů do organické fáze, a proto je zvýšena extrakční účinnost. Metoda je velice jednoduchá na provedení, levná, čas extrakce je v řádech několika vteřin a je dosaženo vysokého obohacovacího faktoru a recovery²⁵. DLLME však není selektivní metoda, protože jsou do organické fáze extrahovány i interferenty. Jedno z řešení by byla kombinace s SPE nebo LLE³.



Obrázek 3.4 - Schéma postupu DLLME metody: 1 - vodný vzorek 2 - přidání směsi disperzního a extrakčního rozpouštědla, 3 - zakalený roztok s kapkami extrakčního rozpouštědla, 4 - na dně zkumavky je fáze extrakčního rozpouštědla vytvořená po centrifugaci²⁶

Mikroextrakce kapkou přímo nadávkovanou na hladinu roztoku (Directly suspended droplet microextraction, DSDME)

Metoda LPME, kde je používána statická mikropapka, má několik nevýhod. Může docházet ke ztrátě kapky v důsledku gravitace nebo vysoké rychlosti míchání, ale na druhou stranu nízká rychlost míchání snižuje prekoncentrační faktor a extrakční výtěžnost. Objem kapky je omezen na 5 μL , což omezuje výběr separačního přístroje pro další analýzu, kdy například HPLC vyžaduje větší objem nadávkovaného vzorku³.

Z těchto důvodů byla vyvinuta nová metoda, při které s vodou nemísitelné rozpouštědlo je přímo nadávkováno na hladinu vzorku, který je míchán pomocí magnetického míchadélka. Po extrakci je rozpouštědlo zpětně odebráno mikrostříkačkou a nadávkováno do přístroje pro další analýzu. Největší nevýhoda této metody je, že je těžké zpětně nasát rozpouštědlo, protože je ho malé množství a může být odebrán i vodný vzorek²⁷.

Mikroextrakce s tuhnoucí plovoucí kapkou (Solidification of floating drop microextraction, SFDME)

Tato metoda je modifikace DSDME, kdy je řešen problém s odebráním rozpouštědla z vodného vzorku. Po extrakci je vzorek přemístěn do ledové vodní lázně, kde rozpouštědlo ztuhne a lze ho snadno odebrat. Při pokojové teplotě rozpouštědlo opět roztaje a je použito pro následující analýzu²⁸. Podmínkou je, aby rozpouštědlo mělo bod tání blízko pokojové teplotě, a proto jsou používány 1-undekanol, 1-dodekanol a n-hexadekan¹.

Metoda SFDME je levná, s nízkou spotřebou organického rozpouštědla a vysokým prekoncentračním faktorem. Jeho nevýhoda je však úzký výběr rozpouštědla, protože jen některá mají bod tání v rozmezí 10-30 $^{\circ}\text{C}$ ¹.

3.2 Optimalizace

Pojem optimalizace je běžně používán ve smyslu nalezení podmínek, při kterých je získána nejlepší odezva systému²⁹. V analytické chemii je často optimalizována příprava vzorku a separace sloučenin³⁰.

Během optimalizace jsou testovány parametry, které mohou být kvantitativní (čas, teplota, koncentrace činidla) nebo kvalitativní (druh rozpouštědla, typ aparatury). U parametrů je před začátkem experimentů určen jejich rozsah hodnot, které definují zkoumanou experimentální oblast. Odezva systému je naměřený výsledek, například výška píku, absorbance nebo elektrický signál^{31, 32}.

Tradičně byla optimalizace prováděna sledováním vlivu jednoho parametru na odezvu systému, zatímco ostatní parametry zůstávaly konstantní. Tato optimalizační technika se nazývá one-variable-at-a-time (OVAT). Její hlavní nevýhodou je, že neobsahuje informaci o interakcích mezi studovanými parametry. Dále je potřeba velké množství experimentů, aby byla realizována samotná optimalizace, což vede k vyšší spotřebě chemikálií, materiálu, které dále vedou k nárůstu nákladů a časové náročnosti²⁹.

Aby bylo možno odstranit tyto nedostatky, byla zavedena optimalizace pomocí vícerozměrných statistických technik²⁹. Díky jednoduchému experimentálnímu designu a statistickým nástrojům pro analýzu dat lze pomocí několika experimentů získat mnoho informací o systému, který je předmětem zkoumání³¹. Další rozdíly mezi oběma přístupy jsou, že u OVAT se rozhodne, který experiment bude následovat podle výsledků z předchozího testu, zatímco u designu jsou experimenty přesně naplánované tak, aby pokrývaly celou experimentální oblast. Proto u OVAT získáme pouze výsledky popisující konkrétní kombinaci parametrů, ale u designu lze získat matematický model, popisující odezvy systému při jakémkoliv nastavení parametrů, dokonce i v místech, kde experimenty nebyly provedeny³³. Všechny tyto důvody vedou k tomu, že v posledních letech stoupá využití vícerozměrných statistických technik, které nahrazují OVAT přístup³⁴.

Mezi nejvýznamnější techniky, které jsou používány v analytické chemii, patří metodologie odezvy plochy (response surface methodology, RSM). RSM je souhrn matematických a statistických technik, pomocí kterých je optimalizován systém. Její princip je založen na vhodnosti polynomické rovnice k experimentálně naměřeným datům²⁹.

3.2.1 Postup optimalizace

Proces optimalizace lze rozdělit do následujících kroků²⁹:

- výběr nezávislých parametrů, které mají největší vliv na systém
- vymezení oblasti experimentu
- volba experimentálního designu a provedení pokusů podle sestaveného plánu měření
- matematicko-statistické zpracování získaných dat pomocí polynomické rovnice
- zhodnocení vhodnosti modelu a zvážení případného posunu experimentální oblasti
- získání optimální hodnoty pro každý studovaný parametr

Mnoho parametrů může ovlivnit studovaný systém a je prakticky nemožné určit a zkontrolovat malé příspěvky od každého z nich. Z tohoto důvodu jsou používány screeningové designy, kterými lze zjistit, které parametry a jejich interakce představují významný efekt²⁹. Po vyhodnocení screeningového měření jsou dále optimalizovány parametry s významným vlivem a ostatní parametry jsou nastaveny na hodnotu, která je pro experiment nejvýhodnější. Například je nastaven nejmenší objem rozpouštědla, protože tím jsou sníženy náklady na experiment³⁵.

U každého parametru jsou zvoleny minimální a maximální hodnoty, které byly vybrány na základě předchozích testů a s přihlédnutím k limitům experimentálního systému³⁰. Dále jsou tyto hodnoty převedeny na kódy

(+1 a -1) odpovídající souřadnicím uvnitř stupnice, které musí být úměrné k jejich umístění v experimentální oblasti. Kódování umožňuje objektivní hodnocení proměnných bez ohledu na jejich velikost v různých řádech²⁹.

Výběr designu je obvykle kompromisem mezi požadovanými informacemi a počtem experimentů, které mají být provedeny³¹. Existuje celá řada designů a každý z nich je vhodný pro jiný typ statistického zpracování a řešení problému³⁵.

Důležité při navrhování designů je, aby proběhlo opakování některých experimentů, protože tím lze získat informaci o chybě experimentu. Dále by měly být experimenty provedeny náhodně, aby jednotlivá měření nebyla na sobě závislá. Někdy je plán měření rozdělen do bloků, které mohou například představovat počet dní, během kterých je změřen celý plán experimentů³⁵.

Předpokládá se, že výsledky experimentu jsou závislé na experimentálních podmínkách, a proto mohou být výsledky popsány jako funkce³²:

$$y = f(x) \quad (3.4)$$

Nejjednodušší polynomičtý model popisuje pouze lineární vztah mezi experimentálními parametry a odezvou. Pro ukázkou byly zvoleny dva parametry x_1 a x_2 ³²:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 \quad (3.5)$$

Další stupeň polynomičtého modelu obsahuje interakce mezi parametry³²:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (3.6)$$

Oba modely jsou hlavně používané pro screeningové studie, ale aby bylo možné určit optimum odezvy, je potřeba zavést polynomičtí rovnici popisující kvadratický model. Tím lze určit i nelineární vztahy mezi experimentálními parametry a odezvou. Příkladem může být kvadratická závislost³²:

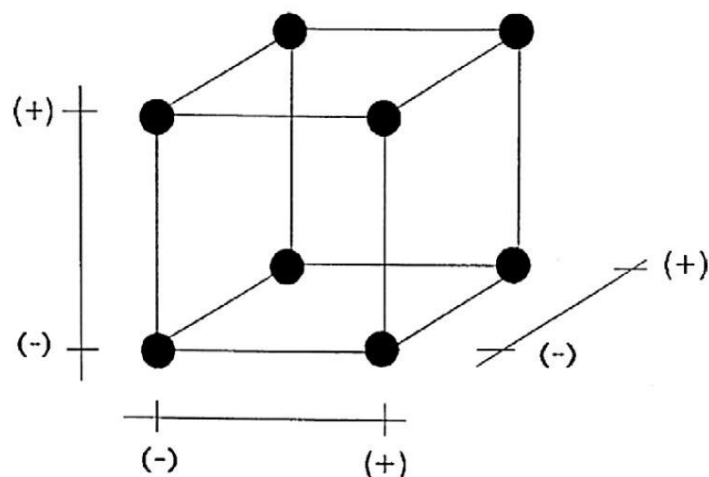
$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (3.7)$$

Získaný model lze testovat pomocí analýzy rozptylu (ANOVA). Základní myšlenkou ANOVA testu je porovnat změny způsobené kombinací různých úrovní parametrů se změnou způsobenou náhodnými chybami, které vznikly během měření. Z tohoto porovnání je možné zhodnotit význam regrese použité k předpovědi výsledků s ohledem na experimentální rozptyl^{29, 36}. Další nástroj k zhodnocení modelu je lack-of-fit, který vyžaduje opakování měření alespoň v centrálním bodě experimentální oblasti. Model dobře popisuje experimentální data, jestliže představuje významnou regresi a nevýznamný lack-of-fit²⁹.

Optimální podmínky lze stanovit u kvadratických modelů jako kritický bod, který je charakterizován buď maximem, minimem nebo sedlem. Jeho souřadnice lze vypočítat první derivací matematické funkce, která popisuje povrch odezvy a odpovídá nule. Grafické znázornění je možné pomocí surface response grafů, které jsou dvou nebo třírozměrné³⁶.

3.2.2 Druhy experimentálních designů

Nejčastěji jsou používány faktorové designy a z nich nejjednodušší je dvouúrovňový faktorový design. Tento design je znázorněn jako krychle, která reprezentuje zkoumanou oblast, a v jejíchž vrcholech jsou úrovně parametrů (Obr. 3.5). Ostatní designy jsou založeny na tomto krychlovém modelu a pouze přidávají další body do krychle, například na střed stran krychle nebo do středu krychle³¹.



Obrázek 3.5 – Grafické znázornění dvouúrovňového faktorového designu pro tři parametry³³

Faktorové designy se dále dělí na plné a frakční. Počet měření u plných designů je 2^k , kde k je počet parametrů. S rostoucím počtem parametrů však roste množství měření, a proto jsou v těchto případech upřednostněny frakční faktorové designy, které vyberou pouze některé experimenty z plného designu³³.

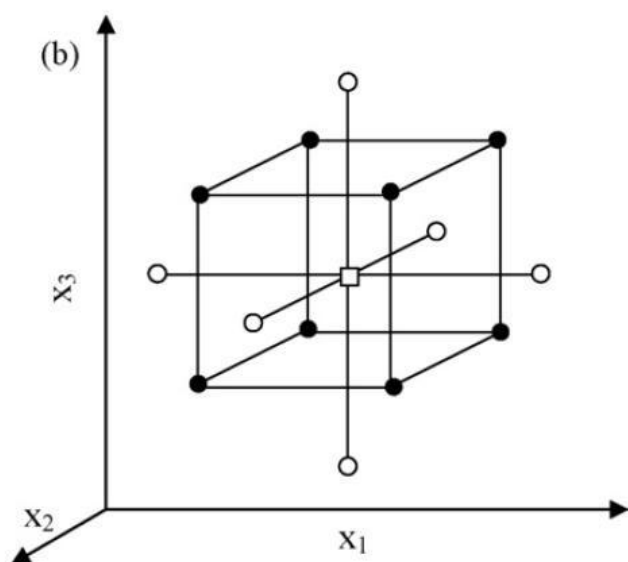
Box-Behnken design popisuje vliv parametrů a jejich interakcí na odezvu systému. Vyžaduje však, že všechny parametry musejí mít tři stupně (-1, 0, +1), které jsou od sebe rovnoměrně rozmístěny. Tento experimentální design byl použit pro optimalizaci několika chemických a fyzikálních procesů, ale jeho uplatnění v analytické chemii je v porovnání s central composite designem zanedbatelné²⁹.

Měřicí plán central composite designu (CCD) lze rozdělit do tří částí. Na začátku jsou experimenty z dvouúrovňového plného nebo frakčního faktorového designu. Dále následují experimenty, při kterých jsou parametry nastaveny v centrálním bodě kromě jednoho parametru, který má α hodnotu

$(-\alpha$ nebo $+\alpha)$. V poslední části měřicího plánu jsou experimenty, kde jsou všechny parametry nastaveny v centrálním bodě³⁴. U plného CCD je určen počet měření podle rovnice:

$$N=k^2+2k+c_p \quad (3.7)$$

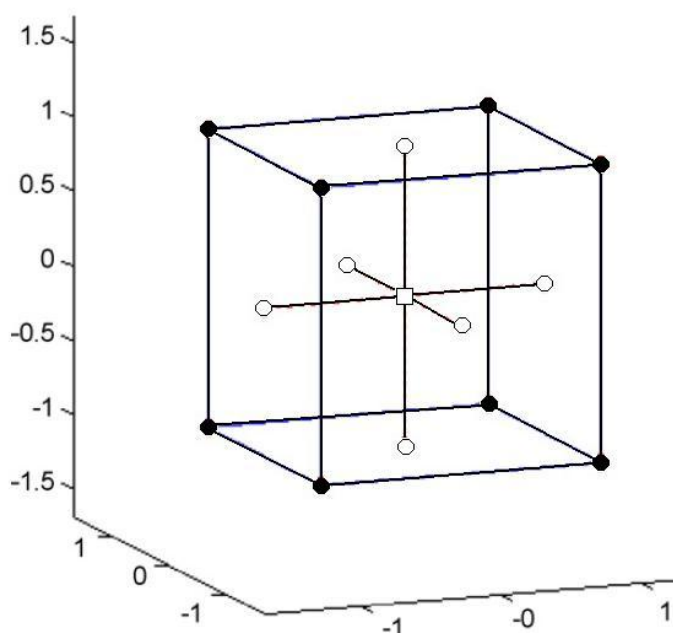
kde k je počet parametrů a c_p je počet opakování centrálního bodu. Další vlastností CCD je, že všechny parametry jsou studovány v pěti úrovních $(-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha)$ ²⁹. CCD je jedna z nejvíce používaných chemometrických metod pro optimalizaci chromatografických systémů³⁴.



Obrázek 3.6 - Grafické znázornění CCD pro tři parametry, kde ● označuje body faktorového designu, ○ a □ je centrální bod³⁴

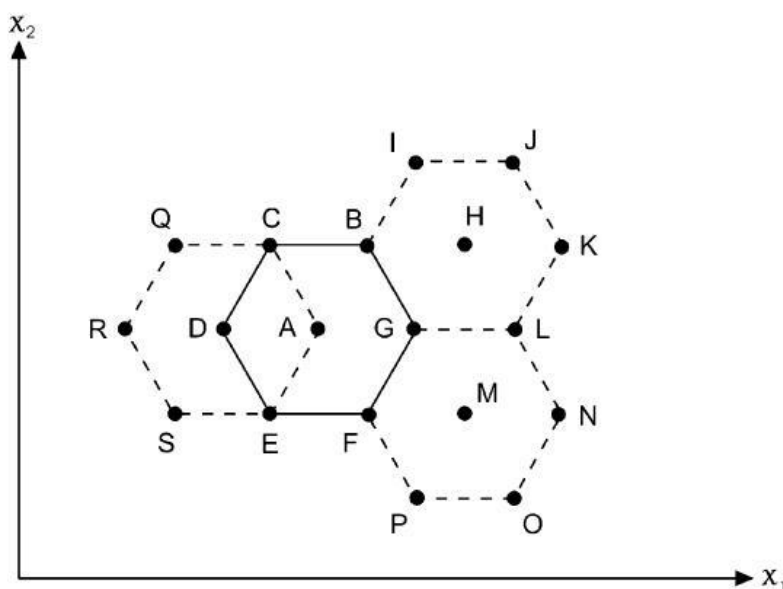
Zvláštním případem CCD je Face centered design, který se skládá z 2^k faktorových experimentů, kde k je počet parametrů. Dále následují $2 \cdot k$ experimenty, při kterých jsou všechny proměnné kromě jedné v jejich centrálním bodě, a v posledních experimentech jsou všechny parametry v centrálním bodě³⁷. Na obrázku 3.7 je znázorněn tento design pro tři

parametry a je zde ukázáno, že název Face centered je odvozen z umístění bodů ve středu stěn krychle³³.



Obrázek 3.7 - Grafické znázornění Face centred designu pro tři parametry, kde ● označuje body faktorového designu, ○ body 2^k experimentů a □ je centrální bod³³

Doehlertův design se od ostatních liší hlavně tím, že obsahuje parametry s různým počtem úrovní, a proto je využíván při řešení problémů, kdy některé parametry vyžadují větší pozornost. Další zajímavou vlastností designu je rovnoměrné vyplnění prostoru, což dále umožňuje posunout experimentální oblast do míst s lepší odezvou systému a zároveň mohou být zachovány některé již provedené experimenty (Obr. 3.8). Tato vlastnost je cenná, pokud jsou experimenty zdlouhavé a finančně náročné³⁴.



Obrázek 3.8 - Grafické znázornění Doehlertova designu pro parametr x_1 s pěti úrovněmi a x_2 se třemi úrovněmi a možnosti posunutí experimentální oblasti se zachováním některých, již naměřených dat³⁴

Odlišným příkladem jsou designy pro směsi. U předchozích designů bylo možné nastavit jakoukoliv hodnotu parametru uvnitř experimentální oblasti nezávisle na hodnotě ostatních parametrů. V designech pro směsi je potřeba, aby součet všech hodnot parametrů byl 1 (100 %), protože je sledován jejich poměr. Tento typ designu je nejčastěji používán pro optimalizaci složení mobilní fáze pro HPLC a dále například pro složení malby obrazů nebo při vytváření nové receptury potravinářských výrobků³³.

3.3 Studované látky

Pro optimalizaci a následné testování nové LPME metody byl vybrán toluen, tetrachlorethylen, ethylbenzen, xyleny, mesitylen a naftalen. Analyty patří mezi těkavé organické látky, jejichž koncentrace je sledována v životním prostředí.

V publikovaných studiích je toluen, ethylbenzen, xylen ještě společně s benzenem uveden pod zkratkou BTEX. Jejich hlavním zdrojem jsou ropné výrobky, jako je benzín. Dále jsou obsaženy v malířských barvách, v pryži a lepidlech. BTEX jsou uvolňovány do ovzduší emisemi z průmyslové činnosti a automobilové dopravy, odkud se deštěm dostávají na zem a kontaminují vodu. Jelikož to jsou těkavé látky, tak jejich koncentrace v povrchových vodách se pohybuje okolo $\mu\text{g/L}$, ale jejich koncentrace v podzemní vodě je větší³⁸. Jejich množství v životním prostředí je kontrolováno, protože působí toxicky na nervový systém, na dýchací systém, ledviny a srdce³⁹. Expozice člověka je přes kontaminovanou vodu, potraviny nebo inhalací⁴⁰.

Tetrachlorethylen je používán jako insekticid, na výrobu polymerů, k odmašťování kovů a jako rozpouštědlo k suchému čištění textilií. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny ho označila jako pravděpodobný lidský karcinogen, který může způsobit rakovinu hrtanu nebo děložního čípku^{41, 42}.

Hlavní použití mesitylenu je v laboratořích jako rozpouštědlo nebo jako výchozí látka pro výrobu barev. Díky jeho dobrým spalovacím vlastnostem je přidáván do automobilových paliv a je studována jeho možnost přidání do paliva pro stíhací letouny⁴³. V atmosféře ale dochází k rozkladu mesitylenu a přispívá tak ke zvýšení koncentrace troposférického ozonu a vzniku sekundárního organického aerosolu⁴⁴.

Naftalen má široké využití jak v průmyslu, tak i v běžném životě, proto je velice rozšířen v životním prostředí. Je používán pro výrobu změkčovadel, barev, pesticidů a je obsažen v repelentech proti molům. Jeho expozice je chronická v malých dávkách přes potravinový řetězec, kůži a plícemi. Způsobuje hepatotoxicitu, nefrotoxicitu, neurotoxicitu a dráždí dýchací systém a oči⁴⁵.

Tabulka 3.1 - Fyzikálně chemické vlastnosti studovaných látek a jejich limity pro podzemní vodu⁴⁶

Název sloučeniny	Sumární vzorec	Číslo CAS	Molekulární hmotnost [g/mol]	Teplota varu [°C]	Limity pro podzemní vodu [µg/L]
Toluen	C ₇ H ₈	108-88-3	92,1	101	860
Tetrachlorethylen	C ₂ Cl ₄	127-18-4	165,8	121	0,07
Ethylbenzen	C ₈ H ₁₀	100-41-4	106,2	136	1,3
Xyleny	C ₈ H ₁₀	1330-20-7	106,2	140	190
Mesitylen	C ₉ H ₁₂	108-67-8	120,2	165	-
Naftalen	C ₁₀ H ₈	91-20-3	128,2	218	0,14

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Standardy a chemikálie

Mikroextrakční technika byla testována s těmito chemikáliemi: toluen ($\geq 99,8\%$, Merck, Německo), tetrachlorethylen ($\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich, USA), ethylbenzen ($\geq 99,0\%$, Fluka, Německo), xyleny (p.a., Lachema, ČR), mesitylen (99% , Fluka, Německo), naftalen ($\geq 98,0\%$, Fluka, Německo) a jako vnitřní standard byl použit methylhexadekanoát ($\geq 99,0\%$, Fluka, USA). Jako extrakční činidlo byl použit hexan ($\geq 97\%$, Sigma Aldrich, Španělsko).

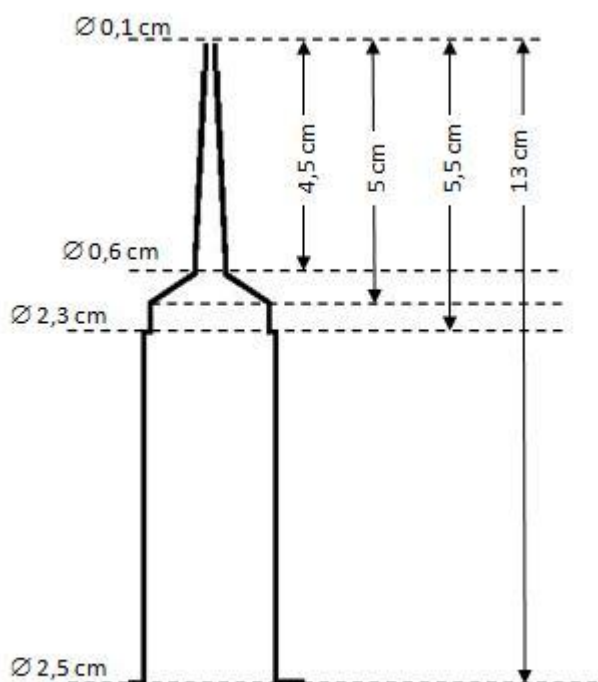
Zásobní roztoky analytů byly připraveny v methanolu ($\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich, Francie). Pro optimalizaci mikroextrakce byl pracovní roztok připraven vhodným ředěním zásobního roztoku v deionizované vodě (Millipore Q-plus Systém, Millipore, USA). Metoda byla testována pomocí reálných vzorků, konkrétně byla analyzována pitná voda (odebrána 10.2. 2014 v budově chemických kateder Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze), říční voda (odebrána 12.2. 2014 z Lužické Nisy v Liberci-Nové Pavlovici) a voda z nátoky do čistírny odpadních vod (odebrána 18.2. z čistírny odpadních vod v Komořanech, Praha)

4.2 Přístrojové vybavení

Koncentrace testovaných analytů v extrakčním rozpouštědle po mikroextrakci byla měřena na plynovém chromatografu s kolonou DB-5MS UI (Agilent Technologies, USA) délky 30 m o vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm (5 % difenyl, 95 % dimethylpolysiloxan). Nosným plynem bylo helium (99,999%, Linde). K analýze látek byl použit plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrem GCMS-QP5050A, Shimadzu (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) s EI ionizací. Ke sběru dat byl využit program LabSolution a k interpretaci hmotnostních spekter knihovna NIST 08.

Vzorky byly váženy na analytických vahách (APX-100, Denver Instrument). K pipetování byly použity automatické pipety (Biohit, Helsinky, Finsko).

Mikroextrakce byla prováděna pomocí 25ml nástavce od společnosti Eppendorf s komerčním názvem Combitips advanced (Obr. 4.1). K promíchání obou fází byla použita magnetická míchačka MR 3001 (Heidolph, Německo). Organická fáze byla odebírána pomocí mikrostříkačky (Hamilton, USA). Pro vytvoření experimentálního designu a k jeho analýze byl využit statistický program Minitab 16 (Minitab Inc., USA).



Obrázek 4.1 – Schematické znázornění nástavce pro mikroextrakci

4.3 Příprava roztoků

Jednotlivé zásobní roztoky analytů o koncentraci 10 mg/mL byly připraveny tak, že do 10mL odměrných baněk bylo napipetováno 116 μ L toluenu, 62 μ L tetrachlorethylenu, 115 μ L ethylbenzenu, 116 μ L xylenu a 116 μ L mesitylenu a

baňky byly doplněny po rysku methanolem. Zásobní roztok naftalenu byl připraven navážením asi 100 mg přesně do 10mL odměrné baňky, která byla doplněna methanolem po rysku. Koncentrace tohoto roztoku byla 10 mg/mL. Vhodným ředěním zásobních roztoků byl připraven pracovní roztok směsi všech analytů a to každý den, aby roztok byl vždy čerstvý před samotnou mikroextrakcí. Výsledná koncentrace analytů ve vodném roztoku, se kterým byla provedena mikroextrakce při optimalizaci metody, byla 0,1 µg/mL. Reálné vzorky byly spikovány analyty na koncentraci desetinásobku LOQ a 50 ng/mL.

Zásobní roztok methylhexadekanoátu o koncentraci 1 mg/mL byl připraven tak, že bylo naváženo asi 5 mg přesně do 5mL odměrné baňky a byla doplněna hexanem po rysku. Vhodným ředěním tohoto zásobního roztoku byl každý den připravován čerstvý pracovní roztok o koncentraci 5 µg/mL, který byl použit při optimalizaci metody i analýze spikovaných reálných vzorků.

Roztoky kalibrační řady, která měla koncentrační rozpětí 5 - 10 000 ng/mL, byly připraveny vhodným ředěním zásobních roztoků analytů. Ve všech kalibračních roztocích měl methylhexadekanoát koncentraci 5 µg/mL.

Všechny zásobní roztoky byly skladovány v lednici při teplotě 4 °C.

4.4 Optimalizace mikroextrakce

Podle informací nalezených v literatuře a zkušeností získaných během předběžných experimentů s extrakčním nástavcem bylo zvoleno šest parametrů, pomocí kterých byla optimalizována metoda. Konkrétně to je objem vzorku, objem extrakčního rozpouštědla, čas mikroextrakce, rychlost míchání, iontová síla a čas po mikroextrakci, během kterého bylo vytvořeno rozhraní mezi oběma fázemi.

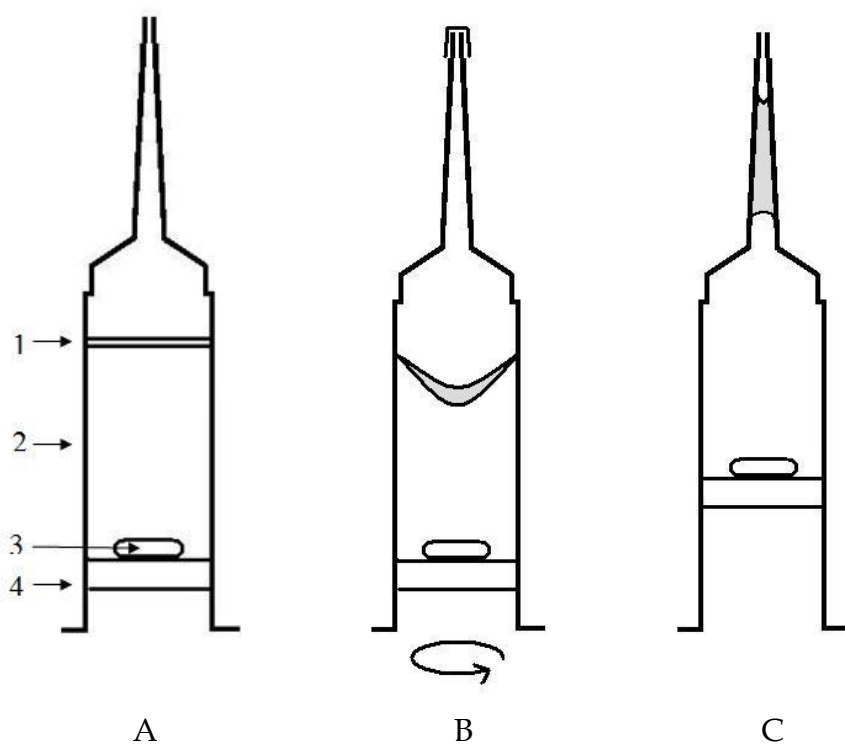
Pro optimalizaci metody byl vybrán Face centered design, díky kterému byly po změření jednoho experimentálního plánu zjištěny významné parametry, jejich vzájemné interakce a byly nalezeny optimální podmínky měření. Jako odezva systému byl zvolen součet relativních ploch píku všech testovaných

analytů. Relativní plocha analytu byla vypočtena z poměru plochy píku analytu a vnitřního standardu.

4.5 Postup mikroextrakce

Byla použita nová extrakční technika, kterou navrhl vedoucí diplomové práce RNDr. Radomír Čabala Ph.D. Hlavní součástí extrakční aparatury je 25mL nástavec a píst s tyčí, kterou lze odšroubovat, aby po nasátí vodného vzorku bylo možné nástavec postavit na magnetickou míchačku. Před samotnou mikroextrakcí bylo potřeba do nástavce vložit magnetické míchadélko, poté zasunout píst a nasát připravený vodný roztok s analyty. Požadovaný objem roztoku byl určen podle stupnice uvedené na nástavci. Při každé mikroextrakci byl píst na úrovni 25 mL. Dále bylo skrz špičku nástavce přidáno extrakční činidlo s vnitřním standardem pomocí mikrostříkačky. Na špičku nástavce bylo umístěno plastové víčko, aby nedocházelo k vypaření rozpouštědla během mikroextrakce.

Mikroextrakce probíhala na magnetické míchačce, na které byla nastavena požadovaná rychlost. Po uplynutí času mikroextrakce byla magnetická míchačka vypnuta, tyč byla zpět našroubována na píst a opatrně bylo s pístem posunuto tak, aby se rozpouštědlo dostalo do špičky nástavce a objevilo se rozhraní mezi oběma fázemi. Po určité době bylo vytvořeno rozhraní mezi fázemi, dále bylo pomocí mikrostříkačky odebráno extrakční činidlo do vialky a vzorek byl analyzován na GC-MS.



Obrázek 4.2 – Schéma postupu mikroextrakce: A aparatura před mikroextrakcí 1 - tenká vrstva mikroextrakčního činidla, 2 - vodný vzorek, 3 - magnetické míchadélko, 4 - píst, B aparatura během mikroextrakce, kdy je vytvořen stabilní vír z mikroextrakčního činidla, C aparatura po mikroextrakci, kdy ve špičce nástavce je vytvořeno rozhraní mezi fázemi

4.6 Analýza GC - MS

Koncentrace testovaných analytů v extrakčním rozpouštědle po mikroextrakci byla měřena na plynovém chromatografu s kolonou DB-5MS UI a hmotnostním spektrometrem GCMS-QP5050A. Pro všechny analýzy byly nastaveny tyto podmínky: nástřik 2,5 μ l vzorku, teplota injektoru 250 $^{\circ}$ C, teplota MS interface 275 $^{\circ}$ C, lineární průtoková rychlost helia 35 cm/s, split poměr 1/25. Teplotní program byl nastaven od 45 $^{\circ}$ C (2 minuty izotermicky) a poté teplota rostla po 30 $^{\circ}$ C za minutu až do 250 $^{\circ}$ C, kde byla držena tato

teplota po dobu 5 minut. Celkový čas analýzy byl 13,83 minut. První měření bylo provedeno ve SCAN módu, aby byly nalezeny retenční časy a nejintenzivnější ionty analytů. Další měření probíhala v SIM módu podle tabulky 4.1.

Tabulka 4.1 – Sledované hodnoty m/z pro jednotlivé analyty v daných časových intervalech, kde nejintenzivnější ionty jsou podtržené. Ethylbenzen a xyleny byly měřeny ve stejném časovém intervalu díky blízkým retenčním časům a sledovaným m/z .

Analyt	Časový interval [min]	m/z
Toluen	3,50 - 3,75	39, 65, <u>91</u> , 92
Tetrachlorethylen	3,90 - 4,10	94, 129, 165, <u>166</u>
Ethylbenzen, xyleny	4,30 - 5,00	65, <u>91</u> , 105, 106
Mesitylen	5,30 - 5,70	77, <u>105</u> , 120
Naftalen	7,00 - 7,40	64, 102, 126, <u>128</u>
Methylhexadekanoát	10,25 - 11,40	43, 87, <u>74</u>

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace mikroextrakce

Pro mikroextrakci byl vybrán 25mL nástavec od společnosti Eppendorf, protože jeho horní část je postupně zúžena až do úzké špičky, ve které je vytvořeno viditelné rozhraní mezi fázemi a extrakční činidlo lze snadno odebrat pomocí mikrostříkačky. Nástavce s menším objemem nemají toto postupné zúžení, a proto nebyly zcela vhodné pro mikroextrakci.

Tato jednoduchá aparatura představuje modifikaci DSDME metody, díky které je řešen problém, jak nejjednodušeji odebrat malý objem extrakčního činidla, aniž by došlo k nasátí vodného vzorku. Na začátku používání této metody byl jediný technický problém, kdy pokud rozpouštědlo bylo už blízko špičky nástavce, bylo nutné posouvat píst velice opatrně, jinak by došlo k vystříknutí a ke ztrátě rozpouštědla. Po získání praxe a dostatečném seznámení s metodou byl tento problém odstraněn.

5.1.1 Výběr úrovní pro testované parametry

Před navržením designu experimentu bylo potřeba určit rozmezí parametrů (objem vzorku, objem extrakčního rozpouštědla, čas mikroextrakce, rychlost míchání, iontová síla a čas po mikroextrakci) na základě předběžných testů. Obvykle jsou hodnoty parametrů vyjádřeny pomocí dvou úrovní kódování, +1 pro vyšší hodnotu a -1 pro nižší. Pro lepší přehlednost však uvádím skutečné hodnoty parametrů.

Horní úroveň pro objem vzorku byla dána objemem nástavce, jehož maximum je 25 mL, ale bylo potřeba ještě místo pro extrakční rozpouštědlo a magnetické míchadélko, proto bylo určeno 20 mL. Naopak dolní úroveň byla zvolena 10 mL, aby byla určitá vrstva vzorku nad míchadélkem a byl prostor pro vytvoření víru z rozpouštědla. Minimální objem rozpouštědla byl 300 μ L, protože když byl použit menší objem, tak docházelo ke ztrátám a po

mikroextrakci nebylo možné odebrat dostatečné množství pro analýzu na GC-MS. Hodnoty maximálního objemu rozpouštědla a maximální rychlosti míchání jsou kompromisem, aby při objemu vzorku 10 mL byl vytvořen stabilní vír z rozpouštědla a nebyl příliš velký, že by se jinak dotýkal míchadélka.

Minimální rychlost míchání byla určena s 20 mL vzorku a 300 µL rozpouštědla, kdy při nízké rychlosti nedocházelo k promíchání obou fází a až při 500 rpm byl vytvořen vír.

Minimální čas mikroextrakce byl stanoven na pět minut, protože je předpokládáno, že za kratší čas by nedošlo k dostatečné extrakci. Maximální čas mikroextrakce 20 minut byl určen podle informací z literatury⁶.

Parametr čas po mikroextrakci byl zařazen, protože během předběžných testů bylo pozorováno, že objem odebraného rozpouštědla je větší za určitou dobu, než když byl odebrán ihned po skončení mikroextrakce. Dále bylo zjištěno, že je lepší hned po mikroextrakci posunout píst do horní části tak, aby bylo rozpouštědlo ve špičce nástavce, protože poté byl opět odebrán větší objem rozpouštědla.

Vliv iontové síly byl testován jako přídavek chloridu sodného, který byl vyjádřen pomocí hmotnostního zlomku. Podle informací z literatury byla zvolena dolní hranice bez přídavku soli a jako horní hranice 17 % (Tab. 5.1)⁴⁷.

Tabulka 5.1 – Testované parametry a jejich úrovně

Parametr	-	+
Objem vzorku [ml]	10	20
Objem rozpouštědla [µL]	300	600
Čas mikroextrakce [min]	5	20
Rychlost míchání [rpm]	500	700
Iontová síla [%]	0	17
Čas po mikroextrakci [min]	3	5

5.1.2 Volba designu

Volba designu je velice důležitý krok během optimalizace, protože jednotlivé typy designů se liší počtem testů a informacemi, které z nich lze získat. Jelikož bylo testováno šest parametrů, nebylo vhodné zvolit plný faktorový design, protože by bylo nutné provést 64 měření. Pomocí Plackett-Burmanova designu lze zjistit, které z testovaných parametrů jsou významné, a lze ho použít pro větší počet parametrů, ale neposkytuje informaci o interakcích mezi parametry³⁶.

Z časové náročnosti a zamezení přílišné spotřeby chemikálií byl vybrán Face centered design. Další důvod, proč byl zvolen tento způsob optimalizace, je, že v klasickém CCD je experimentální plán rozšířen o α body, které mají menší či větší hodnotu než zvolené úrovně parametrů, a tudíž je rozšířena experimentální oblast. S tím by však bylo nutné počítat v předběžných testech systému a nebylo by možné určit úrovně parametrů jako jejich krajní hodnoty, ale muselo by být počítáno s určitou rezervou.

Face centered design byl složen z dvouúrovňového frakčního faktorového designu a jeho modifikace přidáním "face centered" bodů. Tento faktorový design byl rozdělen do dvou bloků, a v každém bloku byla tři měření, při kterých byly všechny parametry v jejich centrálním bodě. Toto opakování bylo zařazeno, aby byla získána informace o případných chybách měření, a jelikož směrodatná odchylka těchto testů byla 3,0 %, lze určit, že experimenty nebyly zatížené chybou.

Celkový počet měření i s modifikací byl 34. Plán měření, který vytvořil statistický program Minitab 16, je v tabulce 5.2. Pořadí měření je náhodné, aby byla zaručena vzájemná nezávislost mezi měřeními³⁵.

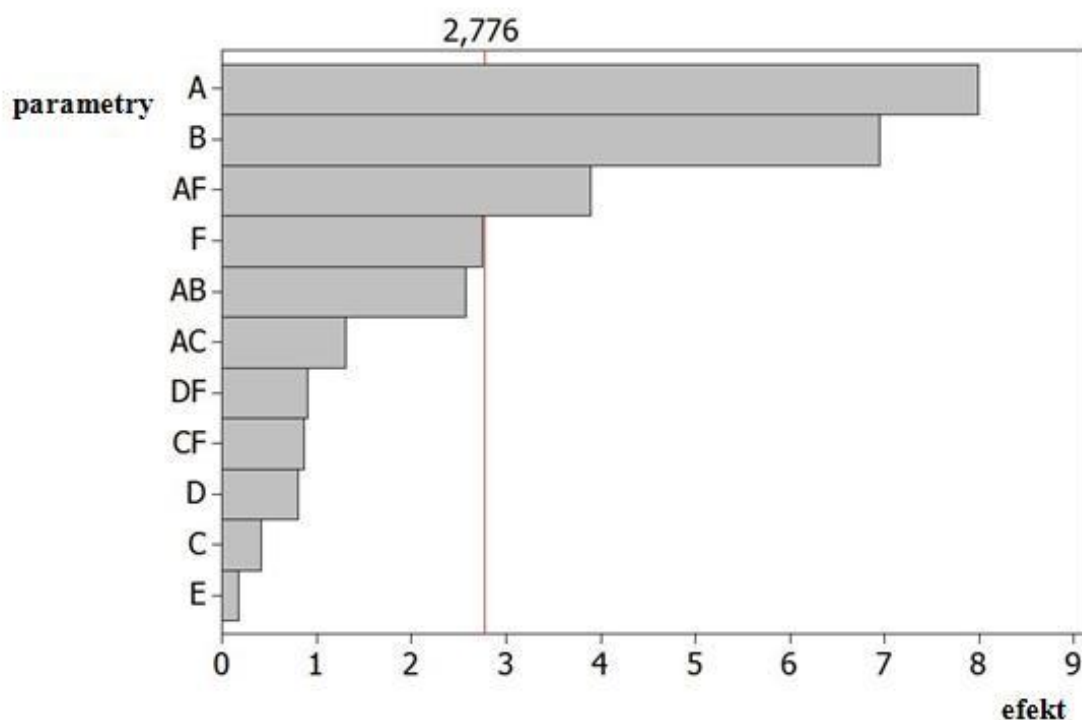
Tabulka 5.2 - Plán měření navržený programem Minitab 16: A - objem vzorku [ml], B - objem rozpouštědla [μ L], C - čas mikroextrakce [min], D - rychlost míchání [rpm], E - iontová síla [%], F - čas po mikroextrakci [min]

Číslo měření	A	B	C	D	E	F
1	10	600	20	700	0	5
2	15	450	12,5	600	25	4
3	10	300	20	700	50	3
4	15	450	12,5	600	25	4
5	20	600	20	500	50	3
6	15	450	12,5	600	25	4
7	20	600	5	700	0	3
8	20	300	5	700	50	5
9	10	600	5	500	50	5
10	20	300	20	500	0	5
11	10	300	5	500	0	3
12	20	300	20	700	0	3
13	10	600	5	700	50	3
14	15	450	12,5	600	25	4
15	10	300	5	700	0	5
16	15	450	12,5	600	25	4
17	20	600	20	700	50	5
18	15	450	12,5	600	25	4
19	10	600	20	500	0	3
20	20	600	5	500	0	5
21	10	300	20	500	50	5
22	20	300	5	500	50	3
23	10	450	12,5	600	25	4
24	20	450	12,5	600	25	4
25	15	300	12,5	600	25	4
26	15	600	12,5	600	25	4
27	15	450	5	600	25	4
28	15	450	20	600	25	4
29	15	450	12,5	500	25	4
30	15	450	12,5	700	25	4
31	15	450	12,5	600	0	4
32	15	450	12,5	600	50	4
33	15	450	12,5	600	25	3
34	15	450	12,5	600	25	5

5.1.3 Vyhodnocení navrženého designu

Pro vyhodnocení navrženého designu byl jako hledaná odezva určen součet relativních ploch píku všech analytů. Výsledky byly podrobeny statistické metodě ANOVA a získané informace jsou uvedeny níže.

Nejprve byl zkoumán vliv jednotlivých parametrů na zvolenou odezvu. Pro přehlednost získaných výsledků byl zvolen Pareto graf, kde na ose y jsou vyneseny jednotlivé parametry a jejich interakce a na ose x jsou jejich standardizované efekty. Svislá referenční čára odpovídá 95% intervalu spolehlivosti. Parametry, které překročí tuto referenční čáru, jsou označeny jako významné³⁶. Z grafu na obrázku 5.1 lze odečíst, že největší vliv na sledovanou odezvu má objem vzorku a objem rozpouštědla. Dále mezi významné parametry je zařazena interakce mezi objemem vzorku a času po mikroextrakci. Hodnota parametru čas po mikroextrakci je 2,75, a proto je těsně za referenční čárou a mezi významné parametry by neměl být zařazen. Naopak nejméně významné parametry jsou rychlost míchání, čas mikroextrakce a iontová síla.



Obrázek 5.1 – Pareto graf pro jednotlivé parametry a jejich interakce: A - objem vzorku, B - objem rozpouštědla, C - čas mikroextrakce, D - rychlost míchání, E - iontová síla, F - čas po mikroextrakci

Dále byla získána polynomičká rovnice s koeficientem determinace R^2 , jehož hodnota 0,9700 ukazuje na dobrou shodu naměřených dat s modelem. V rovnici nejsou zahrnuty parametry s nejmenším vlivem na odpověď, které byly určeny podle jejich p-hodnoty. Koeficienty jednotlivých parametrů z rovnice jsou uvedeny v tabulce 5.3 a samotná rovnice je ukázána níže:

$$R = -13,8250 + 0,8782 \cdot x_A - 0,0240 \cdot x_B + 0,0232 \cdot x_D + 0,0552 \cdot x_E + 4,2894 \cdot x_F + 0,00003 \cdot x_B \cdot x_B - 0,0021 \cdot x_A \cdot x_E - 0,0878 \cdot x_A \cdot x_F - 0,0015 \cdot x_B \cdot x_F \quad (5.1)$$

Tabulka 5.3 - Koeficienty jednotlivých parametrů a jejich interakcí z polynomicke rovnice, A - objem vzorku, B - objem rozpouštědla, D - rychlost míchání, E - iontová síla, F - čas po mikroextrakci

Parametry a jejich interakce	Koeficient
Konstanta	-13,8250
A	0,8782
B	-0,0240
D	0,0232
E	0,0552
F	4,2894
B*B	0,00003
A*E	-0,0021
A*F	-0,0878
B*F	-0,0015

P-hodnota lack-of-fit byla 0,485, což je nad hodnotou 0,05, a proto ho lze označit jako nevýznamný. Z vysoké hodnoty R^2 a nevýznamného lack-of-fit lze usoudit, že získaný model dobře popisuje experimentální data.

5.1.4 Nalezení optimálních hodnot

Pomocí programu Minitab 16 byly nalezeny optimální hodnoty parametrů, jejichž kombinace způsobí maximální odezvu systému. Jediným úskalím při hledání optima byl parametr čas mikroextrakce. Program Minitab 16 předpověděl, že nenastane velká změna odezvy, když bude mikroextrakce probíhat po dobu 5 nebo 20 minut. Z ekonomického hlediska i možnosti provést větší počet analýz za kratší čas by bylo výhodné vybrat čas mikroextrakce 5 minut, proto byla třikrát provedena mikroextrakce po dobu 5 minut a třikrát po dobu 20 minut. Ostatní parametry byly nastaveny na jejich optimální hodnotě. Při mikroextrakci po dobu 5 minut byla získána odezva

systému 4,31, kdežto při mikroextrakci po dobu 20 minut byl výsledek 7,46. Jak lze vidět, delší čas mikroextrakce poskytuje větší odezvu systému, a proto byl vybrán jako optimální hodnota. Dále se tento výsledek shoduje z 95,4 % s předpovězenou hodnotou modelu, která byla 7,82, což ukazuje na dobrou shodu výsledku s modelem.

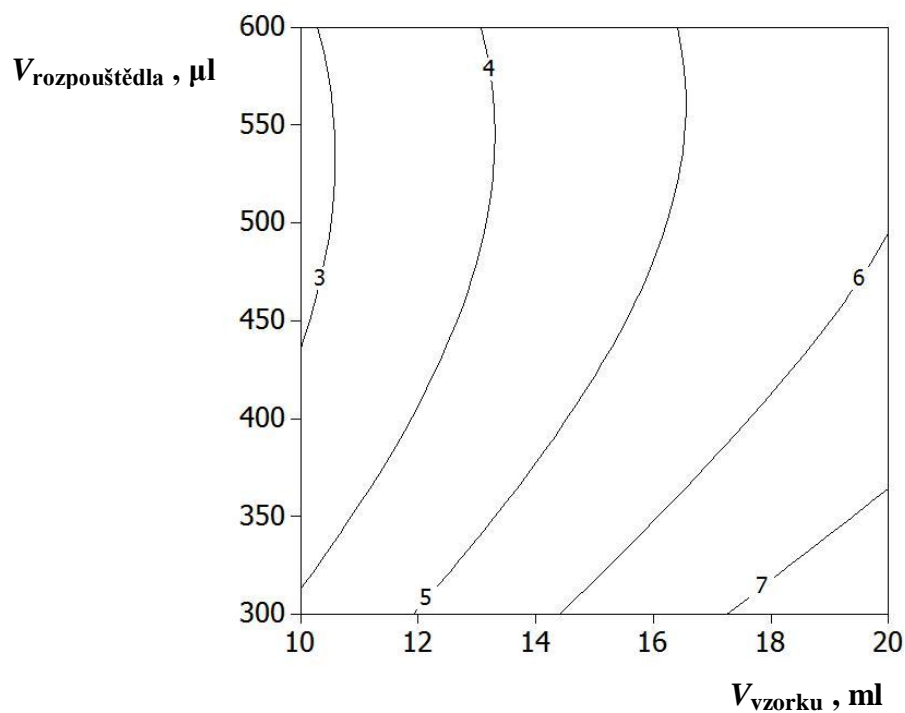
Tabulka 5.4 – Statistické vyhodnocení naměřených zkoušek pro nalezení optimálních podmínek, každá zkouška byla opakována třikrát

$t_{\text{mikroextrakce}}$ [min]	Medián odezvy systému	R	s	s_r [%]
5	4,31	0,36	0,21	5
20	7,46	0,49	0,29	3

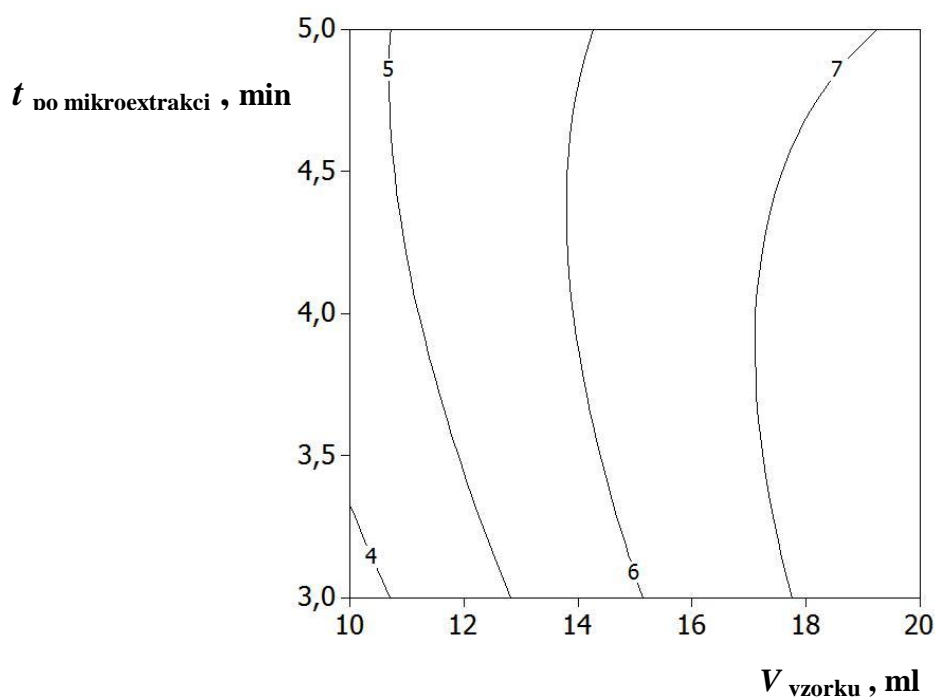
Po provedených experimentech a jejich statistickém zpracování byly nalezeny tyto optimální podmínky systému: objem vzorku 20 mL, objem rozpouštědla 300 μL , čas mikroextrakce 20 minut, rychlost míchání 700 rpm, žádný přídavek soli a čas po mikroextrakci 3,5 minuty.

Z polynomicke rovnice bylo vytvořeno grafické znázornění chování systému, z kterého lze snadno odhadnout odpověď v jakémkoliv bodě experimentální oblasti³³. Program Minitab 16 nabízí dva hlavní typy grafu, a to konturový graf a třírozměrný povrchový graf. Jelikož bylo studováno šest parametrů, tak pro znázornění grafů byly ty parametry, které nejsou uvedeny na osách grafu, nastaveny na konstantní hodnotě, která odpovídá optimu.

V konturovém grafu křivky spojují všechny body, u kterých je odhadnuta stejná hodnota odpovědi³³.

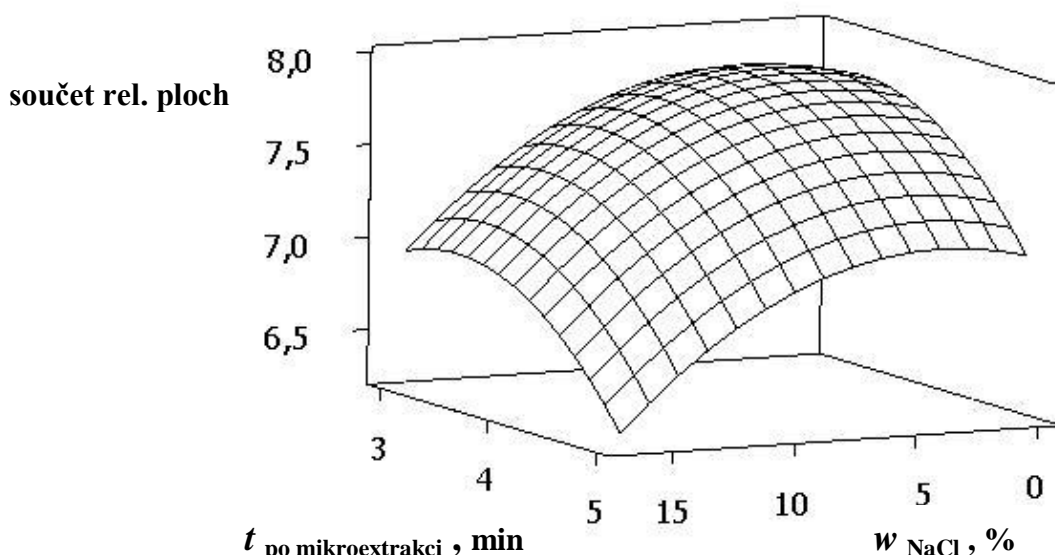


Obrázek 5.2 – Konturový graf odpovědi systému v závislosti na objemu rozpouštědla a na objemu vzorku



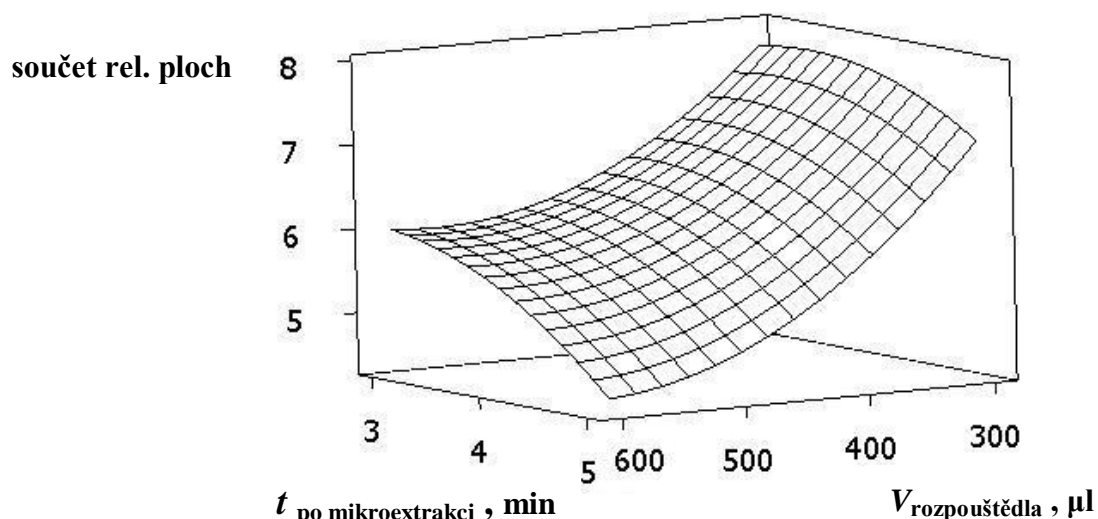
Obrázek 5.3 – Konturový graf odpovědi systému v závislosti na objemu rozpouštědla a na objemu vzorku

Třírozměrné povrchové grafy znázorňují změnu zkoumané odezvy v závislosti na dvou parametrech. Optimum systému bylo určeno v maximálním bodě zobrazené plochy, protože cílem je získat maximální odezvu systému. Toto konkrétní maximum lze snadněji získat z povrchového grafu (Obr. 5.4 - 5.7), kde je postupně znázorněna změna odezvy, kdežto u konturového grafu je tato vlastnost popsána skokově po velkých intervalech.



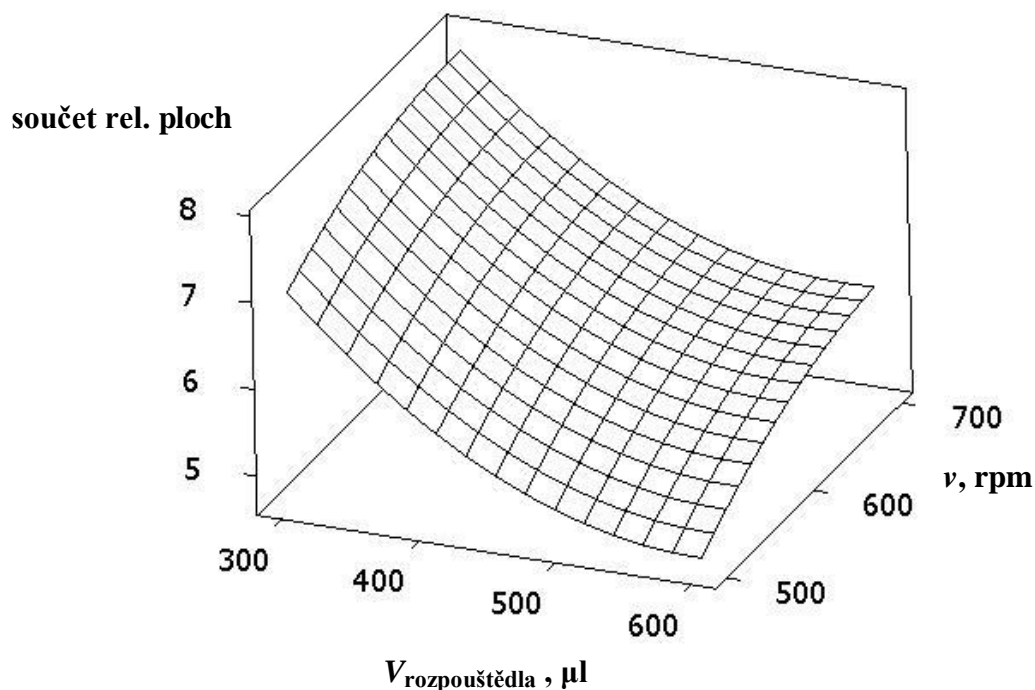
Obrázek 5.4 – Povrchový graf závislosti odezvy systému na vlivu iontové síly a na času po mikroextrakci

Grafy mohou být použity k identifikaci směru, kam je možné rozšířit experimentální oblast, když je hledané maximum mimo ni²⁹. Graf na obrázku 5.5 naznačuje, že kdyby byl použit menší objem rozpouštědla, tak by bylo možné získat větší odezvu systému. Dále je však potřeba zvážit instrumentální omezení. Jelikož z testů před samotnou optimalizací bylo zjištěno, že při objemu vzorku 20 mL by nebyl vytvořen vír z extrakčního činidla při menším objemu než 300 μ L, je změna experimentální oblasti nemožná.



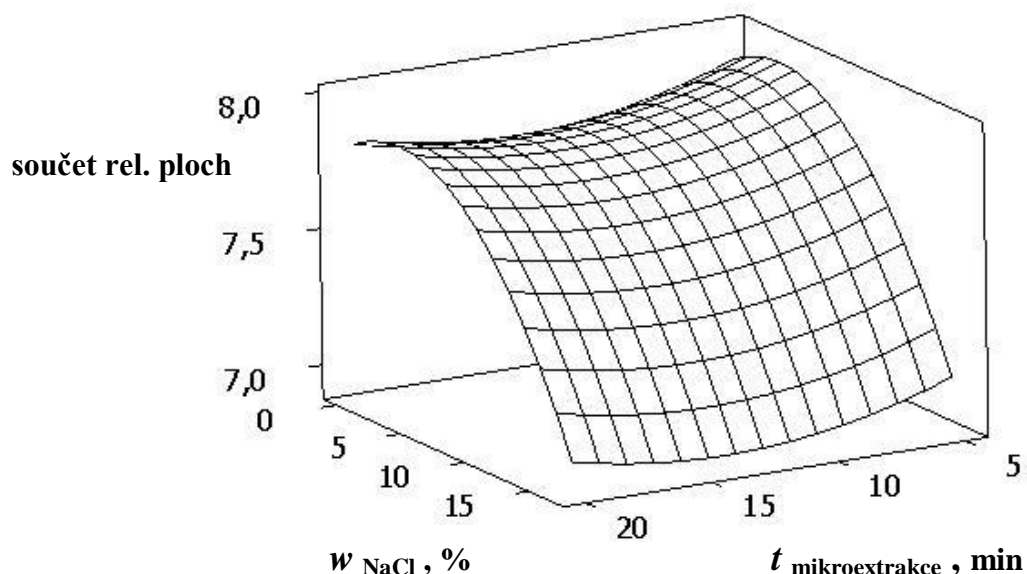
Obrázek 5.5 – Povrchový graf závislosti odezvy systému na času po mikroextrakci a na objemu rozpouštědla

Na obrázku 5.6 je opět vidět, že největší odezva systému je mimo experimentální oblast, tentokrát u obou parametrů. Jako u předchozí ukázky však nelze měnit úrovně parametrů, protože například u rychlosti míchání je to dané hlavně nestabilitou víru při vyšší rychlosti.



Obrázek 5.6 – Povrchový graf závislosti odezvy systému na objemu rozpouštědla a na rychlosti míchání

Jak je již uvedeno výše, program Minitab 16 předpověděl, že změna času mikroextrakce nemá vliv na hodnotu odezvy. Tento jev lze pozorovat na grafu 5.7, kde se plocha pouze nepatrně zvedá směrem k hodnotě 5 a 20 minutám, jinak je prakticky neměnná a maximum plochy závisí pouze na hodnotě hmotnostního zlomku chloridu sodného.



Obrázek 5.7 – Povrchový graf závislosti odezvy systému na vlivu iontové síly a času mikroextrakce

Na tomto příkladu byla ukázána výhoda Face centered designu. Pokud by se postupovalo klasickým způsobem, tak by bylo nejdříve provedeno screeningové měření, kde by bylo zkoumáno, které parametry jsou významné. Podle p-hodnoty z ANOVA testu a následně z Pareto grafu by bylo určeno, že parametr čas mikroextrakce není významný, a proto by byla pro další měření u něho nastavena pro experiment nejvýhodnější hodnota, což by bylo 5 minut. Z takové optimalizace bychom nezískali námi nalezenou maximální odezvu 7,46, ale pouze jen 4,31. Díky měřicímu plánu z Face centered designu nebyly zanedbány žádné interakce mezi parametry až do posledního kroku optimalizace, a proto byly díky jednomu měřicímu plánu získány informace o tom, které parametry jsou významné, byla zhodnocena vhodnost modelu k naměřeným datům a byly nalezeny optimální podmínky systému.

5.2 Kalibrační závislosti

Nejprve byla naměřena kalibrační řada s koncentračním rozpětím 100 – 10 000 ng/mL. Z chromatogramu roztoku s nejnižší koncentrací kalibrace byly zjištěny limity detekce (LOD) a limity stanovitelnosti (LOQ) systému. Díky jejich hodnotám byla kalibrační řada rozšířena a její konečné rozpětí bylo 5 - 10 000 ng/mL. Ve všech kalibračních roztocích měl methylhexadekanoát koncentraci 5 µg/mL. Z naměřených údajů byly vyneseny kalibrační závislosti pro výpočet linearity (Tab. 5.4).

Tabulka 5.4 – Parametry kalibrační závislosti

Analyt	Směrnice přímky	Úsek přímky	Korelační koeficient
Toluen	0,8359	0,0343	0,9997
Tetrachlorethylen	0,1208	0,0003	0,9999
Ethylbenzen	0,9277	0,0144	0,9999
p-, m-Xylen	0,4042	0,0100	0,9999
o-Xylen	0,1279	0,0041	0,9998
Mesitylen	0,6315	0,0130	0,9999
Naftalen	0,1912	0,0049	0,9999

Limity detekce a stanovitelnosti byly vypočteny podle rovnic:

$$LOD = \frac{3c}{S/N} \quad (5.2)$$

$$LOQ = \frac{10c}{S/N} \quad (5.3)$$

Hodnoty poměru signálu k šumu (S/N) byly získány z programu LabSolution, který tyto hodnoty umí přímo vypočítat. Za koncentraci analytu c

byla dosazena koncentrace z kalibrační řady, při níž byla změřena odpovídající hodnota poměru S/N, v našem případě tedy 5 ng/mL.

Uvedené limity detekce a stanovitelnosti jsou pouze instrumentální pro GC-MS (Tab. 5.5). Již tyto hodnoty jsou dostatečně nízké, aby bylo možné stanovit analyty v reálných vzorcích životního prostředí, protože jejich povolené limity v podzemní vodě jsou v řádu µg/L⁴⁶. S použitím mikroextrakce lze dosáhnout ještě nižších limitů.

Tabulka 5.5 - Instrumentální limity detekce a stanovitelnosti pro GC-MS

Analyt	LOD [ng/mL]	LOQ [ng/mL]
Toluen	0,36	1,20
Tetrachlorethylen	0,33	1,08
Ethylbenzen	0,22	0,73
p-, m-Xylen	2,24	7,46
o-Xylen	4,71	15,70
Mesitylen	0,60	2,00
Naftalen	4,70	15,70

Prekoncentrační faktor (*PF*) byl získán proměřením mikroextrakce za optimálních podmínek, kdy byla použita koncentrace analytů 0,1 µg/mL ve vodném roztoku (c_{aq}). Po dosazení naměřených hodnot relativních ploch píku do rovnice kalibrační závislosti byla vypočtena koncentrace analytů v extrakčním činidle (c_{org}), která byla dále použita pro výpočet prekoncentračního faktoru:

$$PF = \frac{c_{org}}{c_{aq}} \quad (5.4)$$

Tabulka 5.6 - Přehled prekoncentračních faktorů zkoumaných analytů z rozdílných mikroextrakčních metod a z metody použité v této diplomové práci, DLLME-SFO = dispersive liquid liquid microextraction method based on solidification of a floating organic drop, FT-LPME = fiber in tube liquid phase microextraction, HFH-LPME = hollow fiber membrane liquid phase microextraction

Cit.	Metoda	PF analytu					
		Toluen	Tetrachlorethylen	Ethylbenzen	Xyleny	Mesitylen	Naftalen
48	HF-LPME GC-FID	98,09		66,45	128		
49	DLLME-SFO GC-FID	142		212	290		
50	LPME-SFO GC-FID	237		274	162		
51	DLLME GC-FID	231		309	311		
40	DSDME GC-FID	255		275	312		
52	FT- LPME GC-FID	361		290	293	224	
42	DLLME-SFO GC-ECD		174				
42	DLLME-SFO GC-MS		228				
53	HFM-LPME GC-MS						160
54	HFM-LLPME GC-MS						210
-	Metoda z této diplomové práce	34	26	35	39	34	33

Porovnáním prekoncentračních faktorů pro metodu z této diplomové práce s faktory z literatury (Tab. 5.6) lze vidět, že nedosahují takových hodnot, i přesto je metoda dostačující pro stanovení analytů v životním prostředí, jak tomu bude ukázáno níže.

Výtěžnost mikroextrakce byla vypočtena podle rovnice:

$$výtěžnost = \frac{c_{org} \cdot V_{org}}{c_{aq} \cdot V_{aq}} \cdot 100 = PF \cdot \frac{V_{org}}{V_{aq}} \cdot 100 \quad (5.5)$$

Tabulka 5.7 – Výtěžnost mikroextrakce pro jednotlivé analyty

Analyt	Výtěžnost [%]
Toluen	51,2
Tetrachlorethylen	39,5
Ethylbenzen	53,1
p-, m-Xylen	59,1
o-Xylen	58,5
Mesitylen	51,0
Naftalen	50,1

Výtěžnost nové metody mikroextrakce byla od 39,5 % pro tetrachlorethylen až po 59,1 % pro p-xylen a m-xylen. Hodnoty není možné porovnat s informacemi z literatury, jako tomu bylo u prekoncentračního faktoru, protože autoři článků neuvádějí tuto vlastnost metody, ale nejčastěji prekoncentrační faktor a recovery. Pouze Faraji a Tajbakhsh⁵⁰ uvedli, že pro toluen byla výtěžnost 52 %, pro ethylbenzen 57 % a pro xyleny 35 %. Z těchto hodnot lze vidět, že výtěžnost pro toluen a ethylbenzen je srovnatelná

s metodou z diplomové práce a u xylenu dosáhli menší výtěžnosti, i přestože se jejich prekoncentrační faktory pohybovaly od 162 do 274.

Z těchto výsledků lze zhodnotit nově studovanou metodu, že její schopnost zakoncentrovat sledované analyty z vodného vzorku do organického rozpouštědla je menší v porovnání s metodami z uvedené literatury, ale její schopnost extrahovat a izolovat analyty je srovnatelná. Jelikož LPME není vyčerpávající extrakce, bylo by dále potřeba optimalizovat metodu, aby byl zvýšen prekoncentrační faktor.

5.3 Analýza reálných vzorků vody

K určení vlivu matrice vzorku na recovery metody je třeba provést mikroextrakci s reálnými vzorky, a proto byla testována matrice pitné, říční a vody z nátoky na čistírnu odpadních vod. Recovery bylo určeno z poměru aktuální koncentrace analytu v mikroextračním činidle k teoretické koncentraci, která by byla získána podle kalibrační závislosti a prekoncentračního faktoru.

Každý reálný vzorek byl třikrát analyzován, jestli neobsahuje studované analyty. Všechna stanovení byla negativní, a proto byly reálné vzorky spikovány analyty na koncentraci odpovídající přibližně jejich desetinásobku LOQ. Druhá sada vzorků byla spikovaná na koncentraci 50 ng/mL. V tabulkách 5.7 – 5.9 jsou uvedeny výsledky měření jednotlivých reálných vzorků a jejich statistické zpracování.

Tabulka 5.7 – Recovery pro jednotlivé analyty ve spikované pitné vodě na koncentraci desetinásobku LOQ a 50 ng/mL

Analyt	Recovery % (s_r %, $n=3$)	
	Spikovaná hladina 10LOQ	Spikovaná hladina 50 ng/mL
Toluen	92 (14)	90 (10)
Tetrachlorethylen	87 (13)	91 (10)
Ethylbenzen	79 (10)	81 (12)
p-, m-Xylen	84 (15)	81 (12)
o-Xylen	78 (13)	80 (14)
Mesitylen	90 (14)	94 (13)
Naftalen	102 (11)	99 (15)

Tabulka 5.8 – Recovery pro jednotlivé analyty ve spikované říční vodě na koncentraci desetinásobku LOQ a 50 ng/mL

Analyt	Recovery % (s_r %, $n=3$)	
	Spikovaná hladina 10LOQ	Spikovaná hladina 50 ng/mL
Toluen	91 (12)	95 (8)
Tetrachlorethylen	89 (14)	95 (8)
Ethylbenzen	81 (5)	85 (8)
p-, m-Xylen	86 (5)	90 (8)
o-Xylen	85 (11)	89 (8)
Mesitylen	92 (14)	106 (7)
Naftalen	95 (14)	108 (9)

Tabulka 5.9 – Recovery pro jednotlivé analyty ve spikované vodě z čistírny odpadních vod na koncentraci desetinásobku LOQ a 50 ng/mL

Analyt	Recovery % (sr %, n=3)	
	Spikovaná hladina 10LOQ	Spikovaná hladina 50 ng/mL
Toluen	101 (14)	104 (11)
Tetrachlorethylen	81 (14)	92 (11)
Ethylbenzen	83 (14)	85 (10)
p-, m-Xylen	88 (12)	84 (10)
o-Xylen	81 (14)	84 (9)
Mesitylen	89 (14)	93 (10)
Naftalen	101 (14)	100 (8)

Recovery se u pitné vody pohybovala od 78 do 102 %, u říční vody od 81 do 108 % a u vody z čistírny odpadních vod od 81 do 104 %. Největší recovery vždy bylo u toluenu a naftalenu. I nejnižší hodnota 78 % u o-xyleny v pitné vodě spikované desetinásobkem LOQ naznačuje, že předpovězené hodnoty lze získat i při mikroextrakci reálných vzorků. Ukazuje se, že vliv matrice není významný na recovery mikroextrakce, protože se v odlišných vzorcích významně nemění.

Hodnoty relativní směrodatné odchylky jsou u pitné vody od 10 do 15 %, u říční vody od 5 do 14 % a u vody z čistírny odpadních vod od 8 do 14 %. Větší hodnoty odchylek mohly být způsobené během postupu mikroextrakce, a protože bylo pracováno s takto nízkými koncentracemi.

Určité nepřesnosti mohly nastat při nasávání vodného vzorku do nástavce, kdy je objem odměřen podle stupnice na nástavci, která je značena po pěti mililitrech. Chyby v měření by mohly být odstraněny, pokud by se například metoda plně zautomatizovala.

I přes vyšší hodnoty relativní směrodatné odchylky a nižšímu prekoncentračnímu faktoru v porovnání s hodnotami z literatury, je nová

metoda konkurence schopná mezi ostatními technikami LPME. Její princip, který vychází z DSDME, ji řadí mezi jednoduché techniky, které nevyžadují složitou a nákladnou aparaturu.

Jelikož byl vyřešen problém s odebráním malého množství organického rozpouštědla, není výběr rozpouštědel omezený jako u SFDME. Navíc s malým objemem 300 μ L rozpouštědla splňuje principy zelené analytické chemie, která minimalizuje spotřebu toxických látek, aby bylo sníženo znečištění životního prostředí, zdravotní riziko personálu v laboratoři a byly sníženy náklady na chemikálie. Další výhodou malého objemu rozpouštědla je, že koncentrace analytu je dostatečně vysoká pro následující analýzu, takže není potřeba zakoncentrovat ho, což bývá častý zdroj ztráty těkavých analytů a současně zvýšení koncentrace nečistot z organického rozpouštědla⁶. Dále 20 mL vodného vzorku zjednodušuje manipulaci během extrakce oproti LLE, kde jsou používány stovky mililitrů³.

Za 20 minut mikroextrakce je získána vysoká výtěžnost, a proto je metoda rychlejší než klasické extrakce, jejichž postup je zdoluhavý. Byla dosažena rychlejší distribuce analytu do extrakční fáze, protože u této metody se nepracuje s kapkou na špičce mikrostříkačky, jako tomu je u SDME, a proto není třeba pracovat opatrně a lze vodný vzorek míchat vyšší rychlostí. Všechny tyto výhody by mohly přispět k tomu, že by byly klasické techniky extrakce postupně nahrazovány metodami LPME.

I když by automatizace přispěla k vyšší přesnosti metody, tak již nyní je technika dostatečně citlivá pro studované analyty a plně kompatibilní se separačními přístroji k další analýze analytů, jako je GC nebo HPLC.

V této diplomové práci byly analyzovány vodné vzorky životního prostředí. Po dalším testování a vhodným výběrem extrakčního činidla by bylo určitě možné rozšířit aplikaci metody na biologické vzorky, vzorky v oblasti forenzní chemie, farmacie a potravinářství, což by mohlo být předmětem další studie.

6 ZÁVĚR

Nová metoda LPME byla optimalizována a byly nalezeny optimální podmínky systému, které byly 20 mL vzorku, 300 μ L rozpouštědla, 20 minut mikroextrakce, rychlost míchání 700 rpm, žádný přídavek soli a čas po mikroextrakci 3,5 minuty. Díky použité chemometrické metodě Face centered design nebyly po celou dobu optimalizace zanedbány žádné interakce mezi parametry, a proto byla zjištěna větší odezva systému při času mikroextrakce 20 minut oproti 5 minutám. Další výhodou použitého designu byl menší počet provedených experimentů v porovnání s ostatními chemometrickými metodami, a tím snížení spotřeby materiálu a nákladů.

Při vyhodnocení navrženého designu byl stanoven koeficient determinace, který byl 0,9700 a lack-of-fit byl nevýznamný, což ukazuje na dobrou shodu modelu s naměřenými daty.

Prekoncentrační faktor analytů byl stanoven od 26 pro tetrachlorethylen až po 39 pro xyleny. Výtěžnost mikroextrakce byla v rozmezí od 39,5 % pro tetrachlorethylen do 59,1 % pro p-xylen a m-xylen. Při analýze reálných vzorků nebyly stanoveny studované analyty, a proto byly vzorky spikovány a byla určena recovery. U pitné vody bylo naměřeno recovery od 78 do 102 %, u říční vody od 81 do 108 % a u vody z čistírny odpadních vod od 81 do 104 %. Největší recovery bylo u toluenu a naftalenu.

Optimální podmínky systému ukázaly, že nová LPME metoda je rychlá a má nízkou spotřebu organického rozpouštědla, a proto snižuje znečišťování životního prostředí. Byla použita jednoduchá aparatura pro mikroextrakci, která vyřešila problém DSDME s odebráním malého objemu rozpouštědla. Dále lze z výsledků zhodnotit, že nová LPME metoda má nižší schopnost zakoncentrovat analyty oproti jiným mikroextrakčním metodám, ale její schopnost izolovat analyty je srovnatelná a lze ji použít na analýzu reálných vzorků.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Han D., Row K. H.: *Microchimica Acta* 176, 1 (2012).
2. Xu L., Basheer C., Lee H. K.: *Journal of Chromatography A* 1152, 184 (2007).
3. Sarafraz-Yazdi A., Amiri A.: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29, 1 (2010).
4. Armenta S., Garrigues S., de la Guardia M.: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27, 497 (2008).
5. Tobiszewski M., Mechlińska A., Zygmunt B., Namieśnik J.: *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28, 943 (2009).
6. Kotianová P., Matisová E.: *Chemické Listy* 94, 220 (2000).
7. Hashemi M., Chasteen T. G.: *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400, 643 (2011).
8. Liu H., Dasgupta P. K.: *Analytical Chemistry* 68, 1817 (1996).
9. Jeannot M. A., Cantwell F. F.: *Analytical Chemistry* 68, 2236 (1996).
10. Ahmadi F., Assadi Y., Hosseini S. M. R. M., Rezaee M.: *Journal of Chromatography A* 1101, 307 (2006).
11. He Y., Lee H. K.: *Analytical Chemistry* 69, 4634 (1997).
12. Ouyang G., Zhao W., Pawliszyn J.: *Journal of Chromatography A* 1138, 47 (2007).
13. Hou L., Lee H. K.: *Journal of Chromatography A* 976, 377 (2002).
14. Theis A. L., Waldack A. J., Hansen S. M., Jeannot M. A.: *Analytical Chemistry* 73, 5651 (2001).
15. Shen G., Lee H. K.: *Analytical Chemistry* 75, 98 (2003).
16. Liu W., Lee H. K.: *Analytical Chemistry* 72, 4462 (2000).

17. Xia L., Hu B., Jiang Z., Wu Y., Liang Y.: *Analytical Chemistry* 76, 2910 (2004).
18. Pedersen-Bjergaard S., Rasmussen K. E.: *Analytical Chemistry* 71, 2650 (1999).
19. Ghambarian M., Yamini Y., Esrafil A.: *Microchimica Acta* 177, 271 (2012).
20. Zhao L., Lee H. K.: *Analytical Chemistry* 74, 2486 (2002).
21. Hou L., Shen G., Lee H. K.: *Journal of Chromatography A* 985, 107 (2003).
22. Rezaee M., Assadi Y., Hosseini M. R. M., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S.: *Journal of Chromatography A* 1116, 1 (2006).
23. Wu C. X., Wu Q. H., Wang C., Wang Z.: *Chinese Chemical Letters* 22, 473 (2011).
24. Zarei A. R., Gholamian F.: *Analytical Biochemistry* 412, 224 (2011).
25. Anthemidis A. N., Ioannou K. I. G.: *Talanta* 80, 413 (2009).
26. Ojeda C. B., Rojas F. S.: *Chromatographia* 69, 1149 (2009).
27. Yangcheng L., Quan L., Guangsheng L., Youyuan D.: *Analytica Chimica Acta* 566, 259 (2006).
28. Khalili-Zanjani M. R., Yamini Y., Shariati S., Jönsson J. Å.: *Analytica Chimica Acta* 585, 286 (2007).
29. Bezerra M. A., Santelli R. E., Oliveira E. P., Villar L. S., Escalera L. A.: *Talanta* 76, 965 (2008).
30. Ferreira S. L. C., Bruns R. E., da Silva E. G. P., dos Santos W. N. L., Quintella C. M., et al.: *Journal of Chromatography A* 1158, 2 (2007).
31. Tye H.: *Drug Discovery Today* 9, 485 (2004).
32. Lundstedt T., Seifert E., Abramo L., Thelin B., Nyström Å., Pettersen J., Bergman R.: *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 42, 3 (1998).
33. Leardi R.: *Analytica Chimica Acta* 652, 161 (2009).

34. Ilzarbe L., Álvarez M. J., Viles E., Tanco M.: *Quality and Reliability Engineering International* 24, 417 (2008).
35. Michálek J.: *Navrhování a vyhodnocování experimentů (DOE)*. Dostupné z URL:
<http://www.crr.vutbr.cz/system/files/brozura_05_1012_2.pdf>
[cit. 7.5.2014]
36. Stalikas C., Fiamegos Y., Sakkas V., Albanis T.: *Journal of Chromatography A* 1216, 175 (2009).
37. Rosales E., Sanromán M. A., Pazos M.: *Environmental Science and Pollution Research* 19, 1738 (2012).
38. Karačonji B., Skender L., Karačić V.: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76, 458 (2006).
39. Es'haghi Z., Ebrahimi M., Hosseini M. S.: *Journal of Chromatography A* 1218, 3400 (2011).
40. Sarafraz-Yazdia A., Amiri A. H., Es'haghi Z.: *Talanta* 78, 936 (2009).
41. Siemiatycki J., Richardson L., Straif K., Latreille B., Lakhani R., Campbell S., Rousseau M. C., Boffetta P.: *Environmental Health Perspectives* 112, 1447 (2004).
42. Leong M. I., Huang S. D.: *Journal of Chromatography A* 1211, 8 (2008).
43. Diévar P., Kim H. H., Won S. H., Ju Y., Dryer F. L., Dooley S., Wang W., Oehlschlaeger M. A.: *Fuel* 109, 125 (2013).
44. Rickard A. R., Wyche K. P., Metzger A., Monks P. S., Ellis A. M., Dommen J., Baltensperger U., Jenkin M. E., Pilling M. J.: *Atmospheric Environment* 44, 5423 (2010).
45. Stohs S. J., Ohia S., Bagchi D.: *Toxicology* 180, 97 (2002).
46. Ministerstvo životního prostředí: *Metodický pokyn MŽP Indikátory znečištění*. Dostupné z URL:
<http://www.mzp.cz/cz/metodiky_ekologicke_zateze> [cit. 7.5.2014]
47. Čabala R., Bursová M.: *Journal of Chromatography A* 1230, 24 (2012).
48. Sarafraz-Yazdi A., Amiri A. H., Es'haghi Z.: *Chemosphere* 71, 671 (2008).

49. Vickackaite V., Pusvaskiene E.: *Journal of Separation Science* 32, 3512 (2009).
50. Faraji H., Tajbakhsh M., Helalizadeh M.: *Analytical Methods* 4, 3372 (2012).
51. Assadi Y., Ahmadi F., Hossieni M. R. M.: *Chromatographia* 71, 1137 (2010).
52. Wang J. X., Jiang D. Q., Yan X. P.: *Talanta* 68, 945 (2006).
53. Basheer C., Balasubramanian R., Lee H. K.: *Journal of Chromatography A* 1016, 11 (2003).
54. Basheer C., Alnedhary A. A., Rao B. S. M., Balasubramanian R., Lee H. K.: *Journal of Chromatography A* 1210, 19 (2008).